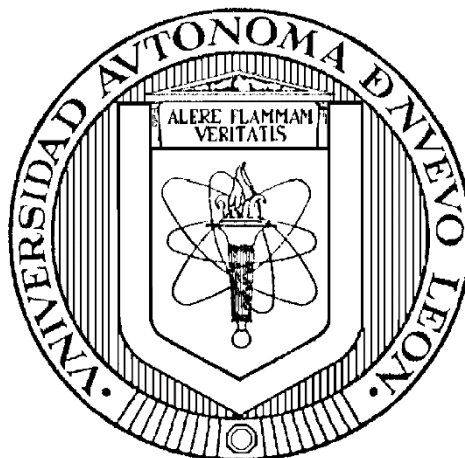


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS EN  
LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2 Y SU EFECTO SOBRE LA  
RESPUESTA Th1 EN UN MODELO *in vitro* DE ACTIVACIÓN CON CFP DE  
*Mycobacterium tuberculosis*.**

**Presentado Por**

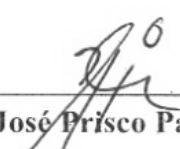
**Q.B.C. GERARDO GARCÍA GONZÁLEZ**

**Como requisito parcial para la obtención del Grado de  
Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

**Junio 2017**


**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS EN  
LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2 Y SU EFECTO SOBRE LA  
RESPUESTA Th1 EN UN MODELO *in vitro* DE ACTIVACIÓN CON CFP DE  
*Mycobacterium tuberculosis*.**

**Aprobación de la Tesis:**



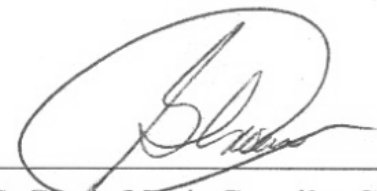
---

**Dr. C. José Prisco Palma Nicolás**  
Director de Tesis




---

**Dr. C. Alejandro Sánchez González**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. C. Gloria María González González**  
Miembro de la comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado



**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS EN  
LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2 Y SU EFECTO SOBRE LA  
RESPUESTA Th1 EN UN MODELO *in vitro* DE ACTIVACIÓN CON CFP DE  
*Mycobacterium tuberculosis*.**

Presentado por: Q.B.C. Gerardo García González

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. José Prisco Palma Nicolás.



---

**Dr. C. José Prisco Palma Nicolás**

Director de Tesis

*Un poco de ciencia aleja de Dios,  
pero mucha ciencia devuelve a Él.*

Louis Pasteur  
(1822-1895)

## **DEDICATORIA**

El costo más caro de este logro es sin duda la inalcanzable  
distancia que hoy nos separa.

Sigo mirando el cielo recordando los momentos a tu lado  
buscando tu rostro en la forma de las nubes.

Por tu amor, tus cariños, tus arrullos y  
todo lo que siempre significarás para mí.

Hasta el cielo te mando el abrazo que te daré el día que estemos juntos de nuevo.

Este trabajo es dedico para ti.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología quiero agradecerle por el apoyo como becario, siendo la manera en la que puedo iniciar esta carrera.

Al Dr. C. José Prisco Palma Nicolás, por incluirme en su equipo de trabajo y ser mi mentor en estos dos años de trabajo, enseñándome a construir un camino en el que el que la recompensa al final es la respuesta a tus cuestionamientos.

A la Dr. C. Gloria María González González por abrirme las puertas del ahora mi casa, el Departamento de Microbiología Médica, recordando desde aquellos primeros mensajes, hasta hoy en día, una de mis mentoras en el correcto quehacer de esta carrera.

Al Dr. C. Alejandro Sánchez González por su siempre disponibilidad de ayuda, sus consejos, su asesoría y el compartir sus experiencias como ejemplos de una forma correcta de actuar en el desarrollo de una vida de ciencia.

A mis amigos Q.B.P. Vanessa Escalona, Q.F.B. Orlando Flores y Q.B.P. Fernando Espinosa por ser mi apoyo en estos dos años, volviéndolos ahora, recuerdos que solo nosotros compartimos. A mis microhermanos les debo mucho del crecimiento personal que viví en este tiempo, enseñándome otras formas de pensar, ayudándome a entender y siendo cómplices en tantas ocasiones. El compartir el gusto por la

microbiología es lo que nos llevó a encontrarnos en el mismo sitio, pero a su vez, fue la estrategia de la vida para poder llevarme a mi siempre querida Vane y a la tremendísima “LH” en mis recuerdos.

A mi diplococo, Q.B.C. Mayra Rodríguez por estar siempre dispuesta a emprender conmigo nuevas aventuras y pasar conmigo estos dos años de locuras. Siempre será un placer afrontar nuevos retos a tu lado.

A mis profesores del departamento, el Dr. C. Miguel Ángel Becerril, Dr. C. Romel Hernández, Dr. C. Ángel Andrade, Dr. C. Rogelio Treviño y Dr. C. Mariana Elizondo por compartir sus conocimientos y estar siempre disponibles a la resolución de inesperadas inquietudes.

A todos los compañeros que conocí en mis dos años de maestría y que al día de hoy se volvieron mis microamigos. A “las chicas de la otra generación” M.C. Carolina Luna, Dr. C. Alexandra Montoya, M.C. Saira Martínez, M.C. Sonia Aguilar; los compañeros del CRCEI M.C. Álvaro Colin, M.C. Byron Bodden, M.C. Lizbeth Campos, Q.B.P. Luis Rodríguez, Q.C.B. Gladis Garza, M.C.P. Ernesto Huerta, Q.C.B. Alma Medrano; a mi equipo de micobacterias Q.B.P. Aurora Luna, M.C., Luis Cortez, Q.B.P. Noemí Huerta; y a “los neófitos” M.C. Christian Campos, Q.F.B. Rebeca Sánchez, Q.F.B. Karen Méndez y Q.B.P. Marcos Arroyo. De todos ustedes me llevo experiencias, grandes amistades, grandes enseñanzas y momentos que me prometo jamás olvidaré.

A mis padres Filiberto y Lorena, mis hermanas Mariana y Angélica, el resto de mi familia que siempre está para mí, mis amigos y todos aquellos que siempre están

ahí dispuestos a apoyarme. No hay duda que son ellos, mi familia y amigos, quienes son el motor que me impulsa todos los días a seguir adelante buscando la manera de crecer cada día más. Es por ustedes que hoy día me encuentro aquí, alcanzando un nuevo objetivo en mi vida.

A todos, todas las personas mencionadas en estas palabras...

**¡MUCHAS GRACIAS!**

# TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Tuberculosis pulmonar.	1
1.1.1. Generalidades.	1
1.1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	3
1.1.3. Aspectos epidemiológicos de la tuberculosis pulmonar.	5
1.2. Fisiopatología de la tuberculosis humana.	7
1.2.1. Infección pulmonar (primoinfección).	7
1.2.2. Latencia y reactivación de la tuberculosis.	9
1.3. Respuesta inmune a la infección por <i>M. tuberculosis</i> .	10
1.3.1. Respuesta inmune protectora Th1.	10
1.3.2. Inmunosupresión y anergia.	11
1.3.3. El balance Th1/Th2 y la progresión a tuberculosis activa.	12
1.4. Respuesta celular de los macrófagos a la infección por micobacterias.	13
1.4.1. Ontogenia y maduración del linaje monocítico.	13
1.4.2. Polarización y características de los MΦ M1/M2.	19
1.4.3. Plasticidad de los MΦ M1/M2 en la infección.	22
1.5. Las proteasas como potenciales moduladores de la respuesta celular.	26
1.5.1. Los PARs y los efectos biológicos de su activación.	28
2. ANTECEDENTES.	34

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	36
4. JUSTIFICACIÓN.	38
5. OBJETIVOS.	39
5.1. Objetivo general.	39
5.2. Objetivos específicos.	39
6. HIPÓTESIS.	40
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	41
7.1. Purificación de monocitos.	41
7.2. Evaluación morfológica de células CD14 <sup>+</sup> por tinción de Giemsa.	44
7.3. Evaluación de la expresión de marcadores de monocitos por citometría de flujo.	45
7.3.1. Tinción directa.	45
7.3.2. Tinción indirecta.	46
7.4. Observación de marcadores de monocitos por inmunofluorescencia.	48
7.4.1. Expresión de marcadores CD14/CD11b en monocitos.	48
7.4.2. Expresión de PARs en monocitos.	49
7.5. Protocolo de diferenciación de MΦ M1/M2.	49
7.5.1. Diferenciación convencional de MΦ.	50
7.5.2. Diferenciación de MΦ con el empleo de serin proteasas.	52
7.6. Cuantificación de IL-12 e IL-4 por ELISA como marcadores de diferenciación de macrófagos M1/M2.	55
7.7. Observación de la expresión de CCR7 y CD206 como marcadores diferenciales en macrófagos diferenciados	57



M1/M2.	
7.8. Ensayo de estimulación en CMSP con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	58
7.8.1. Estudio de proliferación celular ante el estímulo con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	58
7.8.2. Producción de citocinas ante el estímulo con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	59
7.9. Evaluación de la polarización de MΦ M1/M2 en condiciones de co-cultivo con linfocitos autólogos y en estímulo con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	61
7.10. Análisis estadístico.	62
8. RESULTADOS.	63
8.1. Observación morfológica de células purificadas CD14 <sup>+</sup> por tinción de Giemsa.	63
8.2. Observación de marcadores por inmunofluorescencia de monocitos purificados.	64
8.2.1. Expresión de CD14 y CD11b como marcadores de monocitos.	64
8.2.2. Expresión de PARs en monocitos purificados.	65
8.3. Cuantificación de marcadores por citometría de flujo de células purificadas CD14 <sup>+</sup> .	66
8.3.1. Cuantificación de CD14 y CD11b como marcadores de purificación de monocitos.	66
8.3.2. Niveles de expresión de CCR7 y CD206 en monocitos purificados.	67
8.3.3. Niveles de expresión de PARs en monocitos purificados.	69
8.4. Efecto del IFN-γ/LPS y la IL-4 en la polarización de MΦ M1 y M2.	71
8.4.1. Cambios morfológicos en los monocitos dependientes de estímulo.	71
8.4.2. Cuantificación de IL-12 e IL-4 en la diferenciación.	73

8.4.3. Expresión diferencial de CCR7 y CD206 en MΦ diferenciados.	74
8.5. Efecto de trombina y tripsina en la polarización de MΦ.	76
8.5.1. Cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con proteasas.	76
8.5.2. Producción de IL-4 en MΦ diferenciados con proteasas.	79
8.5.3. Las proteasas inducen la expresión del receptor de manosa (CD206).	81
8.6. Las CMSP responden ante el estímulo de CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	83
8.6.1. Evaluación de la capacidad proliferativa.	83
8.6.2. Cuantificación de IL-2 como marcador de proliferación celular.	85
8.6.3. CFP de <i>M. tuberculosis</i> induce un perfil de respuesta Th1 en CMSP.	86
8.7. Los MΦ diferenciados se plastifican ante el estímulo de CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	88
8.7.1. Los MΦ M2 revierten su fenotipo a MΦ M1 cuando son diferenciados con IL-4.	88
8.7.2. Los MΦ M2 diferenciados por acción de trombina y tripsina incrementan la producción de IL-4 posterior al estímulo con CFP.	91
9. DISCUSIÓN.	96
10. CONCLUSIÓN.	102
11. PERSPECTIVAS.	104
REFERENCIAS.	105

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Representación gráfica de la pared celular micobacteriana.	5
2. Distribución de Tb en México.	7
3. Desarrollo inmunológico de la infección por <i>M. tuberculosis</i> desde el establecimiento en el pulmón.	12
4. Condiciones de polarización de MΦ y su fenotipo producto de la diferenciación.	22
5. Representación de un PAR y sus dominios de activación.	29
6. Gradiente de densidad de histopaque.	42
7. Representación del sistema de inmunomagnetismo.	43
8. Esquema del protocolo de diferenciación en el tiempo para MΦ M1 y MΦ M2.	50
9. Esquema del protocolo de diferenciación en el tiempo empleando trombina y tripsina.	52
10. Observación morfológica de monocitos por tinción de Giemsa.	63
11. Expresión de CD14 y CD11b en monocitos por inmunofluorescencia.	65
12. Expresión de PAR1, PAR2 y PAR3 en monocitos purificados por inmunofluorescencia.	66
13. Niveles expresión de CD14 y CD11b en células purificadas.	67
14. Niveles expresión de CD14 y CCR7 (A), y CD14 y CD206 (B) en células purificadas.	69

<b>15.</b> Niveles expresión de CD14 y PAR1 (A), CD14 y PAR2 (B), y CD14 y PAR3 (C) en células purificadas.	70
<b>16.</b> Cambios morfológicos en células estimuladas con INF- $\gamma$ /LPS.	72
<b>17.</b> Cambios morfológicos en células estimuladas con IL-4.	72
<b>18.</b> Producción de IL-12 (A) e IL-4 (B) en M $\Phi$ diferenciados.	73
<b>19.</b> Expresión de CCR7 en M $\Phi$ M1.	75
<b>20.</b> Expresión de CD206 en M $\Phi$ M2.	75
<b>21.</b> Efecto en la morfología celular de M $\Phi$ en la diferenciación con trombina y tripsina y con GM-CSF y M-CSF.	77
<b>22.</b> Cambios morfológicos dependientes de los agonistas de los PARs en la diferenciación de M $\Phi$ .	78
<b>23.</b> Cuantificación de IL-12 e IL-4 dependiente de la activación de los PARs.	79
<b>24.</b> Producción de IL-4 en monocitos estimulados con trombina y tripsina.	81
<b>25.</b> Expresión de CD206 en monocitos estimulados con trombina y tripsina y estimulación previa con GM-CSF.	82
<b>26.</b> Expresión de CD206 en monocitos estimulados con trombina y tripsina y estimulación previa con M-CSF.	83
<b>27.</b> Desarrollo de la proliferación celular en CMSP estimuladas con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	84
<b>28.</b> Representación gráfica de la proliferación en CMSP con CFP en 5 días.	85
<b>29.</b> Producción de IL-2 en CMSP estimuladas con CFP de <i>M. tuberculosis</i> como marcador de proliferación celular.	86

<b>30.</b> Producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-12 en CMSP estimuladas con CFP de <i>M. tuberculosis</i> en dos individuos.	87
<b>31.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ M1 estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	89
<b>32.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ M2 estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	90
<b>33.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ diferenciados con M-CSF más trombina y tripsina, y estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	92
<b>34.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ diferenciados con GM-CSF más trombina y tripsina, y estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	93
<b>35.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ diferenciados con M-CSF más el agonista de PAR1/PAR2, y estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	94
<b>36.</b> Producción de citocinas en M $\Phi$ diferenciados con GM-CSF más el agonista de PAR1/PAR2 y estimulados con CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	95
<b>37.</b> Polarización de M $\Phi$ dependientes del estímulo IFN- $\gamma$ /LPS, IL-4 y trombina/tripsina, y su perfil de citocinas en respuesta a CFP de <i>M. tuberculosis</i> .	103

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Combinaciones de marcajes empleados en la determinación de pureza de monocitos por citometría de flujo.	45
2. Combinaciones de marcajes empleados en la determinación de los niveles de expresión de los PARs en monocitos.	47
3. Tratamientos aplicados en el modelo de diferenciación con base en la activación de los PARs.	53
4. Diluciones de anticuerpos y concentraciones de estándares en la determinación de IL-12 e IL-4 por ELISA tipo sándwich.	56
5. Diluciones de anticuerpos y concentraciones de estándares en la determinación de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4 por ELISA tipo sándwich.	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Ag	Agonista.
ANOVA	Análisis de varianza.
ASB	Albumina sérica bovina.
CCR7	Receptor de quimiocina C-C tipo 7.
CD14 <sup>-</sup>	CD14 positivo.
CD14 <sup>+</sup>	CD14 negativo.
CFP	Proteína de filtrado de cultivo.
CMH	Célula madre hematopoyética.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
CMtb	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
EDTA	Etilendiamino tetraácetico.
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
F1	Fase 1.
F2	Fase 2.
F3	Fase 3.
Fc	Fracción cristizable.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato.
<i>g</i>	Gravedades.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico.
HRP	Peroxidasa de rábano picante.
IL-4	Interleucina 4.
IL-12	Interleucina 12.
INF- $\gamma$	Interferón gamma.
LPS	Lipopolisacárido.
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos.
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio.
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Buffer de fosfatos salino.
PE	Ficoeritrina.
PFA	Paraformaldehído.
pH	Potencial de hidrógeno.
PMC	Progenitor mieloide común.
PGM	Progenitor de granulocitos y macrófagos.
PMD	Progenitor de macrófagos y células dendríticas.
PMo	Progenitor de monocitos.
PDC	Progenitor de células dendríticas común.
rpm	Revoluciones por minuto.
SBF	Suero bovino fetal.
SNC	Sistema nervioso central.
Tb	Tuberculosis.
Tb-MDR	Tuberculosis multirresistente.
Th1	T cooperadora 1.
Th2	T cooperadora 2.
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.
%	Porcentaje.

#### Cluster de diferenciación.

CD	SINÓNIMO
CD4	
CD8	
CD11b	Cadena $\alpha$ M de integrina.
CD14	Receptor de lipopolisacárido.
CD16	FC $\gamma$ RIIIA.
CD32	FC $\gamma$ RIIA.
CD40	TNFRSF5.



CD86	Glucoproteína tipo 1 de cadena única.
CD206	Receptor de manosa.
CD135	Receptor de tirosina cinasa; STK-1.
CD163	Receptor carroñero.

#### **Unidades de medida.**

<b>SÍMBOLO</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
N	Normal.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
pg	Picogramo.
mg	Microgramo.
μL	Microlitro.

## RESUMEN

Q.B.C. Gerardo García González

Fecha de Graduación: Junio 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

**Título del estudio:** PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2 Y SU EFECTO SOBRE LA RESPUESTA Th1 EN UN MODELO *in vitro* DE ACTIVACIÓN CON CFP DE *Mycobacterium tuberculosis*.

**Número de páginas:** 123.

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica.

**Área de estudio:** Micobacteriología Médica.

Los receptores activados por proteasas (PARs) son una subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G de cuatro miembros de los cuales una característica es la activación por serin proteasas y cuyos efectos han sido descritos como muy diversos, entre ellos con implicaciones en el sistema inmune. Por su parte en modelos murinos de tuberculosis se ha evidenciado la presencia de estas enzimas y se sugiere una implicación importante en los granulomas generados por esta infección, en los cuales, el fenotipo adquirido por los macrófagos (MΦ) juega un papel de suma importancia en el combate efectivo de esta enfermedad. **Objetivos:** Conocer la participación de los PARs en la polarización de macrófagos M1/M2 y el perfil de citocinas producidos en un modelo *in vitro* de infección con CFP de *M. tuberculosis*. **Material y Métodos:** Se purificaron monocitos de sangre periférica de individuos PPD positivos, sobre los cuales se establecieron programas de diferenciación a MΦ M1 con IFN-γ/LPS, MΦ M2 con IL-4 y empleando las enzimas trombina y tripsina; posterior a la diferenciación se co-cultivaron con CFP para inducir un perfil de citocinas cuantificado por ELISA. **Resultados:** Los MΦ M1 y M2 mostraron un perfil de citocinas Th1 posteriores a la estimulación con CFP, mientras que aquellos MΦ M2 diferenciados con las enzimas eran productores de un perfil de citocinas mixto Th1/Th2. **Conclusión:** La activación de los receptores PARs polariza los monocitos a MΦ M2 y estos presentan un perfil de citocinas mixto en la estimulación con los antígenos de *M. tuberculosis*.



---

Dr. C. José Frisco Palma Nicolás

Director de Tesis

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Tuberculosis pulmonar.

##### 1.1.1. Generalidades.

La tuberculosis (Tb) es considerada una enfermedad que históricamente aparece con la ganancia de la capacidad patógena por parte del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* en el África de hace unos 70,000 años aproximadamente, empezando su diseminación con la migración de su hospedero<sup>1,2</sup>. Aunque existe una teoría en la cual los hombres fueron capaces de transmitir la enfermedad a los animales con la aparición de la domesticación de los mismos<sup>3</sup>, un estudio comparativo del genoma del complejo *M. tuberculosis* (CMtb) en humanos con el CMtb que afecta a animales, sugiere que esa adquisición de un nuevo hospedero no está relacionada con la domesticación de animales, por lo que los agentes que infectan tanto a humanos como animales comparten un origen ancestral que pudo adaptarse a ambos tipos de hospedero incluso antes del neolítico<sup>4</sup>. Posteriormente, con el incremento poblacional y el establecimiento de civilizaciones socialmente más limitadas y actividades que forzaron el sedentarismo como la agricultura, es

como se seleccionaron cepas de *M. tuberculosis* con una mayor virulencia y transmisibilidad<sup>5,6</sup>.

Aunque la Tb es una enfermedad descrita desde la antigüedad, no es sino hasta los trabajos de Robert Koch en 1882 en los que se descubre que esta es una enfermedad cuya etiología es de carácter infeccioso a cargo del microorganismo *M. tuberculosis*<sup>7</sup> también conocido como bacilo de Koch en su honor.

La Tb es una enfermedad que principalmente se desarrolla como una afección pulmonar por la inhalación del microorganismo<sup>8</sup>, aunque eso no impide que pueda presentar otras manifestaciones clínicas conocidas como Tb extrapulmonar<sup>9</sup>. Dado la naturaleza primordial de la infección que es la colonización de los pulmones, el organismo es fácilmente transmisible por vía aérea mediante los aerosoles generados al toser o estornudar<sup>10</sup>, estimándose que un individuo con la enfermedad activa pueda infectar de entre 10 a 15 personas en el transcurso de un año<sup>11</sup>, siendo las personas más propensas a la enfermedad aquellas que presentan una infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>12</sup>, padecen alteraciones funcionales a nivel del sistema inmune, enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, estados de desnutrición o consumidores de tabaco<sup>11</sup>.

Entre las especies de micobacterias causantes de Tb además de *M. tuberculosis sensu stricto* se encuentran *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. mungi* y *M. orygis*, comprendiendo el CMtb<sup>13</sup>. La distribución de estas especies como agente causal de tuberculosis es muy variada tanto en hospederos como en ubicación geográfica encontrando

por ejemplo a *M. bovis* y *M. caprae* como el causal de la tuberculosis en animales domésticos<sup>14</sup> o a las especies de *M. canetti* y *M. microti* con una baja incidencia en zonas específicas del continente africano<sup>15,16</sup>.

Aunado a la complejidad que representa la enfermedad por sí misma y las repercusiones que representa en la salud pública a nivel mundial, recientemente se han observado cepas de *M. tuberculosis* con la capacidad de resistir a ciertos fármacos antituberculosos como la isoniazida y la rifampicina, (medicamentos de primera línea considerados eficaces para la eliminación de la infección); estas cepas son consideradas actualmente como las causantes de la Tb multirresistente (Tb-MDR). Aunque existen medicamentos que pueden ser utilizados para el combate de la Tb-MDR con una serie de fármacos conocidos como de segunda línea (por ejemplo etionamida y cicloserina), actualmente se conoce la existencia de nuevas cepas capaces de resistir a esta nueva opción de tratamiento<sup>17</sup>.

### **1.1.2. *Mycobacterium tuberculosis*.**

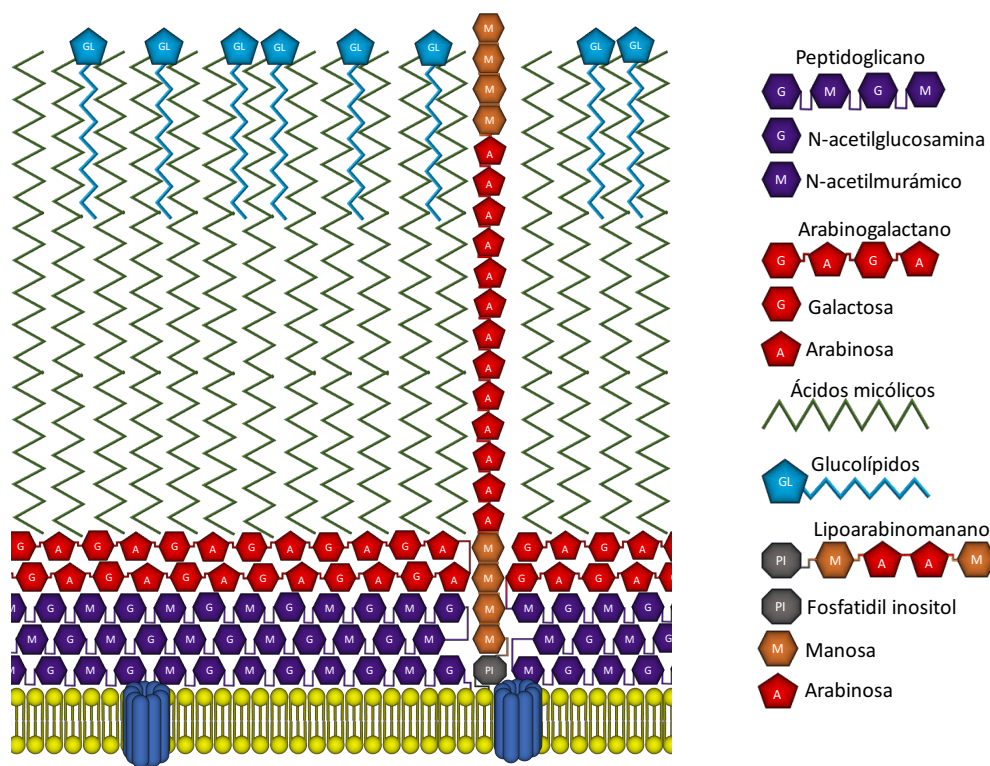
Dentro del género *Mycobacterium* se han identificado más de 100 especies gracias a la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S<sup>18</sup>, estimándose poco más de 20 especies las que presentan cierto grado de patogenicidad en el humano<sup>10</sup>, y entre estas es particularmente *M. tuberculosis* la que con mayor frecuencia se aísla como causante de esta enfermedad. Dentro de esta especie de micobacteria la cepa H37Rv es en la cual se ha logrado hacer la

secuenciación de su genoma encontrando  $4.4 \times 10^6$  pares de bases (pb) con aproximadamente 4,000 genes<sup>19</sup>.

*M. tuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa, aerobia estricta, cuya principal célula blanco son los macrófagos (MΦ)<sup>12</sup>. Es un microorganismo que mide de 0.3-0.5 μm de diámetro con una longitud variable, según la tinción de Gram reacciona como un microorganismo débilmente Gram positivo cuya característica distintiva es la elevada presencia de lípidos en su pared celular<sup>20</sup>. La pared celular de las micobacterias actúa como una barrera contra condiciones ambientales adversas además de ser impermeable a diversos compuestos, incluyendo los propios fármacos anti-Tb<sup>14</sup>. La estructura de la pared celular está compuesta por una delgada capa de peptidoglicanos unida covalentemente a un polímero de arabinogalactanos; seguida de cadenas de ácidos grasos largos (ácidos micólicos) compuestos por más de 90 carbonos, además de encontrarse glucolípidos, proteínas formadoras de poro y lipoarabinomananos (LAM), los cuales confieren la naturaleza antigénica a la micobacteria<sup>21-23</sup> (Figura 1).

Entre las características que permiten la diferenciación de esta especie se encuentra el lento crecimiento en cultivos *in vitro* el cual comprende de 12-25 días a 37 °C, produciendo colonias pequeñas color beige; entre sus características bioquímicas se encuentra la producción de niacina, ureasa, catalasa, y reduce los nitratos a nitritos<sup>12</sup> además de ser termolábil. *M. tuberculosis* es un microorganismo que puede resistir el ambiente intrafagosomal impidiendo la maduración del fagosoma<sup>24-26</sup>, esto por un lado

gracias al sistema de secreción ESX-1 que permite la liberación de efectores al citosol de la célula hospedera<sup>27,28</sup>, evitando alteraciones como cambios de pH, hipoxia, privación de nutrientes y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno<sup>29-31</sup>. Además del sistema de secreción ESX-1, en *M. tuberculosis* también se presentan los sistemas ESX-2, ESX-3, ESX-4 y ESX-5 favoreciendo la virulencia de la especie<sup>32</sup>.



**Figura 1. Representación gráfica de la pared celular micobacteriana.**

### 1.1.3. Aspectos epidemiológicos de la tuberculosis pulmonar.

La Tb es un problema de salud pública que aqueja a todo el mundo, estimándose que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo y es causante de más de dos millones de muertes al

año<sup>8,33</sup>, constituyéndose como la principal causa de muerte por un agente infeccioso<sup>10</sup>. Aunque la mayoría de los individuos que viven con la infección por *M. tuberculosis* permanecen en un estado de latencia, se estima que entre el 5-10 % de estos progresaran en la forma activa de la enfermedad en algún momento de su vida<sup>34</sup>.

Se tienen reportes sobre la reducción de los casos de Tb durante las primeras ocho décadas del siglo XIX en Estados Unidos<sup>35</sup> con un incremento entre 1985 y 1992 debido a esquemas ineficientes en la atención a esta enfermedad, la epidemia de VIH, la inmigración de personas desde zonas endémicas y la aparición de la Tb-MDR<sup>36</sup>. Desde 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la Tb como una emergencia de salud a nivel mundial debido a la cantidad de individuos infectados en el mundo y su alta tasa de mortalidad<sup>17</sup>.

En el reporte expedido por la OMS en el 2017 se establece a la Tb como una de las principales 10 causas de muerte en el mundo. Se estima que en 2015  $10.4 \times 10^6$  personas enfermaron de Tb y que  $1.8 \times 10^6$  murieron por la misma causa; el 35% de las muertes asociadas a VIH fueron por este padecimiento y unas  $4.8 \times 10^5$  personas desarrollaron Tb-MDR. La India, seguida de Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica son los seis países que lideran la lista de países con la mayor mortalidad, comprendiendo en conjunto el 60% de los casos de muerte por esta enfermedad<sup>17</sup>.

Solamente en México la secretaría de salud menciona en su informe epidemiológico del 2016 la aparición de 15,769 casos nuevos de Tb en el país ese año, donde los estados que lideran los primeros tres lugares de casos



nuevos son Baja California Norte, Veracruz y Nuevo León, respectivamente<sup>37</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Distribución de Tb en México.** Los estados de la republica con los tres primeros lugares de casos en el 2016.

## **1.2. Fisiopatología de la tuberculosis humana.**

### **1.2.1. Infección pulmonar (primoinfección).**

La Tb es una enfermedad que aunque puede afectar a diversos órganos y sistemas de organismo el 90% de los casos se restringe a la infección pulmonar<sup>38</sup>, siendo otros blancos patológicos el sistema nervioso central (SNC),

aparato digestivo, sistema genitourinario, osteoarticular, entre otros, los cuales en conjunto reciben el nombre de Tb extrapulmonar, aquejando principalmente a pacientes en condiciones de inmunocompromiso<sup>9</sup> y comprendiendo estos casos entre un 15-20 %<sup>39</sup>. Una de las condiciones más severas de Tb extrapulmonar es la “tuberculosis miliar”, observada en el 10 % de los casos<sup>40</sup>, y frecuentemente relacionada con pacientes inmunocomprometidos o adultos mayores; en este caso la bacteria se disemina por sistema circulatorio y puede alcanzar a establecerse en cualquier órgano<sup>41</sup>.

El proceso infeccioso inicia al inhalar los bacilos a partir de las secreciones respiratorias de un individuo con tuberculosis activa, estableciéndose la bacteria en los pulmones en primer lugar<sup>42</sup>. Sin embargo, para que la enfermedad alcance a establecerse como tal debe considerarse la concentración del inóculo con el que un individuo se infecta y la condición inmunológica en la que se encuentra. La inmunidad celular del hospedero se activa y contiene o elimina la replicación de la micobacteria, todo esto entre 3 y 6 semanas aproximadamente posteriores a la infección, siendo solo el 5% de los individuos expuestos los que evolucionan a la enfermedad activa a lo largo de los siguientes dos años post-exposición<sup>43</sup>.

En los individuos que tienen la enfermedad activa se presenta fiebre, astenia, disnea, debilidad, pérdida de peso progresiva, tos productiva con esputo purulento con o sin hemoptisis. Si en este estado de la enfermedad el individuo presenta una eficiente respuesta inmunológica, la sintomatología disminuye gradualmente hasta una completa desaparición, con la eliminación del bacilo de las secreciones pulmonares y la contención de su replicación a

nivel pulmonar, sin embargo un pequeño número de bacilos permanecen viables por un tiempo indefinido (tuberculosis latente)<sup>42</sup>.

### **1.2.2. Latencia y reactivación de la tuberculosis.**

La Tb latente es un estado asintomático, posterior a la exposición y el establecimiento de *M. tuberculosis*, donde se establece una respuesta inmune específica que mantiene controlada la replicación del microorganismo dentro de los MΦ, pero que tiene la capacidad de reactivarse, permitiendo la recuperación de la actividad proliferativa del agente<sup>10,44</sup>. Estas cepas pueden presentar una elevada tasa de resistencia a los antibióticos<sup>45</sup>. Este episodio de la enfermedad puede ser evidenciado por una reacción positiva a la intradermorreacción a la tuberculina o la observación de lesiones pulmonares en exámenes radiológicos<sup>44</sup>. La infección latente de la Tb puede revertirse a la forma activa de la enfermedad, siendo la principal causa de este fenómeno el declive de la respuesta inmune del individuo<sup>10</sup>; entre las consecuencias de dicho fenómeno la generación de una inmunodeficiencia por una coinfección con el VIH es de las principales causas debido a una reducción en los niveles de células T CD4 específicas contra el bacilo de Koch<sup>46</sup>.

Se estima que cerca del 10% de los individuos infectados pueden presentar un cuadro de reactivación en algún momento de su vida, siendo otras causas además de la inmunosupresión por VIH, la malnutrición, el alcoholismo, tabaquismo crónico, enfermedades crónicas como la diabetes e inclusive la

edad avanzad. Entre las manifestaciones que presentan los individuos reincidentes en esta enfermedad se encuentra tos productiva con esputo hemoptoico, fiebre, fatiga, diaforesis, pérdida de peso y malestar general, observando por ejemplo en imágenes radiológicas la formación de cavidades pulmonares<sup>47</sup>.

### **1.3. Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*.**

#### **1.3.1. Respuesta inmune protectora Th1.**

Posterior a la inhalación y establecimiento de *M. tuberculosis* en los pulmones<sup>48</sup>, las primeras células en reconocer al patógeno serán los MΦ alveolares<sup>49</sup>. Estas células tienen la capacidad de fagocitar al microorganismo y destruirlo, o al menos contenerlo para evitar su replicación, lo cual depende del estado inmunológico del individuo<sup>48</sup>. Por otro lado, las células dendríticas residentes una vez que censan la presencia del antígeno micobacteriano, éstas puedan llevar a cabo su capacidad de fagocitosis y entonces son llevados en un proceso de migración celular a los ganglios linfáticos regionales donde se lleva a cabo el proceso de presentación antigénica a los linfocitos T vírgenes<sup>50</sup>, los cuales, dada la naturaleza del antígeno se polarizan a células Th1 CD4<sup>+</sup> productores de IFN-γ, todo esto dependiente de la producción de IL-12<sup>49,51,52</sup>. Otras células productoras de IFN-γ son los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células NK<sup>34,49,52</sup>.

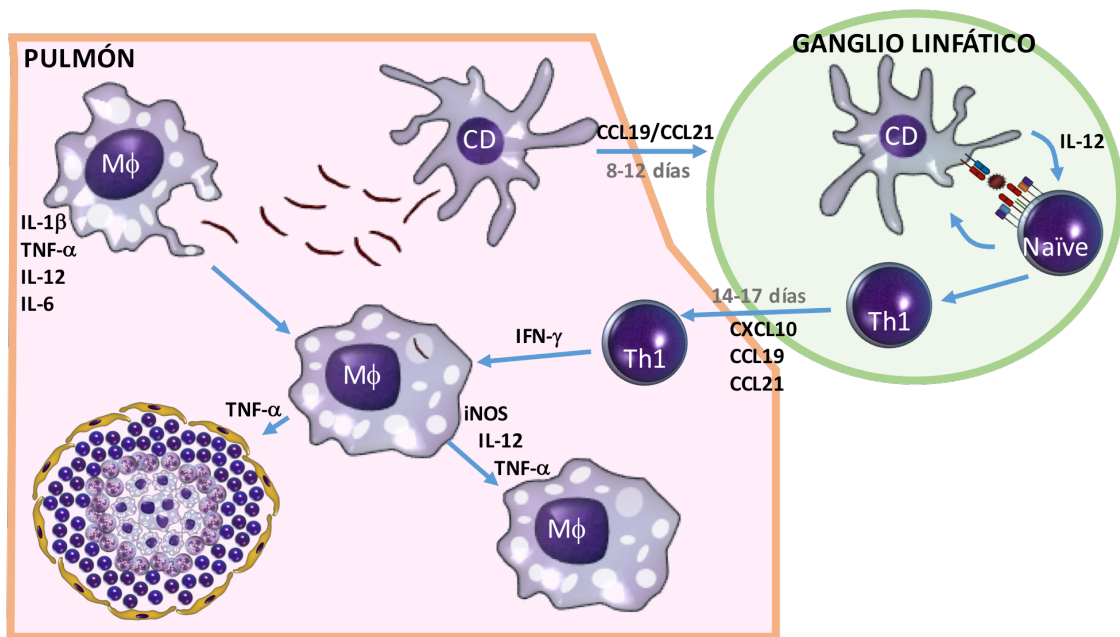
El IFN- $\gamma$  producido por las células Th1, principalmente, es esencial para el control de la infección por *M. tuberculosis*<sup>49,52</sup>, promoviendo la expresión de iNOS en los M $\Phi$  de ratones, lo que conduce a la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno indispensables para la destrucción de las micobacterias<sup>53,54</sup>, aunque hay menor evidencia de esto en M $\Phi$  humanos<sup>55</sup>; sin embargo, se sabe que el IFN- $\gamma$  es necesario para promover la maduración del fagolisosoma<sup>56</sup> y la inducción de péptidos antimicrobianos<sup>57</sup>.

### **1.3.2. Inmunosupresión y anergia.**

Durante la tuberculosis es característica la presencia de inmunosupresión, caracterizada por la producción de la IL-10, la cual es una citocina reguladora que aminora la respuesta inflamatoria y limita la efectividad de la respuesta Th1 del hospedero, favoreciendo la cronicidad de la infección<sup>58</sup>. La IL-10 es una citocina producida por células como los M $\Phi$ , neutrófilos, células dendríticas, y linfocitos B y T<sup>58</sup>, entre sus funciones se encuentra limitar la capacidad de presentación antigénica, además de inhibir la producción de la IL-12<sup>59-61</sup>; por otra parte favorece la sobrevivencia de patógenos intracelulares al impedir la formación del NO y la producción de TNF en los M $\Phi$ <sup>61,62</sup>. Se ha demostrado en modelos murinos que la inhibición de la señalización de la IL-10, mejora la producción de citocinas como el IFN- $\gamma$  y el TNF, favoreciendo la producción de quimiocinas e incrementando la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup>, así como su diferenciación a células Th1<sup>63</sup>.

### 1.3.3. El balance Th1/Th2 y la progresión a tuberculosis activa.

La naturaleza antigénica de *M. tuberculosis* tiene como consecuencia la polarización de las células T CD4<sup>+</sup> hacia un fenotipo Th1 caracterizado por la producción de IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$ <sup>49,51,52</sup> el cual, potencia las funciones de los M $\Phi$  incrementando su actividad fagocítica, aumenta la expresión de iNOS, la producción de TNF- $\alpha$  y la capacidad de presentación antigénica<sup>64</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Desarrollo inmunológico de la infección por *M. tuberculosis* desde el establecimiento en el pulmón.** *M. tuberculosis* puede ser fagocitado por los M $\Phi$  alveolares y destruido o contenido en granulomas; por su parte las células dendríticas residentes de pulmón pueden fagocitar y migrar a ganglios linfáticos donde llevan a cabo la presentación del antígeno a linfocitos T, los cuales al polarizarse en células efectoras Th1 regresan al sitio de la infección.

En conjunto, esto es un ambiente efectivo para eliminar la infección debido a las condiciones desfavorables que se inducen para la micobacteria<sup>65</sup>. Sin embargo, en algunas circunstancias este sesgo hacia el fenotipo Th1 puede equilibrarse e inclusive superarse por una respuesta del tipo Th2, un fenómeno que puede ser atribuido a diversos factores, como el estado inmunológico del individuo, una coinfección con VIH, la virulencia de una cepa en particular, entre otros<sup>66-68</sup>. En dichos casos la respuesta pro-inflamatoria se reduce o inhibe, dominando ahora un ambiente anti-inflamatorio con predominio de IL-4 e IL-10<sup>69</sup>, las cuales son promotoras de un ambiente favorable para el establecimiento de *M. tuberculosis*.

#### **1.4. Respuesta celular de los MΦ a la infección por micobacterias.**

##### **1.4.1. Ontogenia y maduración del linaje monocítico.**

Los monocitos son una subpoblación de células sanguíneas procedentes de la médula ósea<sup>70</sup> a partir de la célula madre hematopoyética (CMH)<sup>71</sup>, la cual mediante una serie de procesos de proliferación y diferenciación adquiere distintos estadios intermedios en el linaje mieloide<sup>72</sup> pasando por el progenitor mieloide común (PMC)<sup>73</sup>, el progenitor de granulocitos y macrófagos (PGM)<sup>73</sup>, el progenitor de macrófagos y células dendríticas (PMD)<sup>74</sup> y el progenitor de monocitos (PMo), el cual se diferencia del PMD por carecer de la expresión del marcador CD135<sup>75</sup>. Los monocitos han sido considerados como el reservorio de

los precursores mieloides para la recuperación de MΦ y células dendríticas, sin embargo, actualmente se sabe que muchas subpoblaciones de estas células (por ejemplo, células dendríticas de órganos linfoides, células dendríticas plasmocitoides, células de Langerhans) corresponden a un PMD independiente de monocitos, originándose en ocasiones directamente en la médula ósea, por ejemplo, el progenitor de células dendríticas común (PDC)<sup>76</sup>. Los últimos estados de inmadurez del linaje monocítico corresponden al monoblasto y el promocito, las cuales pueden ser identificados por un tamaño superior, citoplasma azul-gris y la presencia de nucléolos, estas formas celulares son finalmente liberadas de la médula después de un tránsito de 60 horas en promedio a la circulación sanguínea como monocitos maduros<sup>77</sup> donde permanecen en circulación por un promedio de 1 – 2 días<sup>71</sup>. El proceso de diferenciación de los distintos estadios de maduración del linaje monocítico es principalmente regulado por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), producido por las células estromales<sup>78</sup>, y bajo condiciones de inflamación por ejemplo, por el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), favoreciendo también la maduración de los fagocitos mononucleares<sup>79,80</sup>. Los monocitos constituyen en promedio del 5 – 10 % de los leucocitos totales circulante en sangre periférica<sup>72</sup>. Estas células tienden a ser muy pleomórficas con variaciones del tamaño de 12 – 20 μm, lo que las convierte en las células de mayor tamaño en circulación. El citoplasma es color azul gris disperso regularmente en toda la célula con presencia de gránulos finos; el núcleo tiende a presentar una morfología irregular, aunque su



característica forma arriñonada es distintiva<sup>77</sup>.

Los monocitos son células muy heterogéneas que pueden ser clasificadas como monocitos inflamatorios, monocitos anti-inflamatorios y monocitos intermedios, según la expresión de marcadores de superficie y la función que desempeñen<sup>81</sup>. El receptor de lipopolisacárido (LPS) o CD14 es una molécula altamente expresada en la superficie de los monocitos y el cual ha sido considerado como el marcador ideal para la identificación de esta célula<sup>81</sup>. Con base en la expresión del CD14 y el también variablemente expresado CD16, los monocitos presentan tres fenotipos: los monocitos clásicos o inflamatorios presentan una alta expresión de CD14 y nula expresión de CD16 ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ); por su parte, los monocitos intermedios presentan altas concentraciones del CD14 en la membrana y bajas de CD16 ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ). Finalmente, los monocitos no clásicos o antiinflamatorios poseen una baja expresión de CD14 con respecto a la elevada expresión del CD16 ( $CD14^{+}CD16^{++}$ )<sup>70,82</sup>.

Los monocitos clásicos además de la característica expresión de CD14 también expresan TLR y CCR2, reconocen PAMPs y fagocitan microorganismos y detritos celulares. Producen citocinas, mieloperoxidasa, superoxidasa y son inductores de inflamación. Los monocitos clásicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ) están presentes en circulación en un 85%, con respecto a las otras subpoblaciones<sup>71</sup>. Esta subpoblación de monocitos tienen la distinción de migrar a los sitios de inflamación y secretar citocinas que estimulen la inflamación localizada o sistémica, para después diferenciarse en  $M\Phi$

inflamatorios los cuales tienen una acción mejorada para remover PAMPs y restos celulares<sup>72,81</sup>. Este fenotipo de monocitos humanos tienen como equivalente en los ratones a los monocitos con alta expresión del Ly6C<sup>hi70</sup>.

Por su parte los monocitos no clásicos que comprenden un 10 % de los monocitos circulantes<sup>71</sup> expresan grandes cantidades de MHC-II y CD32, además del receptor de quimiocinas CCR5<sup>72</sup>. Estos monocitos se vuelven MΦ residentes de tejido donde se diferencian en MΦ antiinflamatorios, los cuales tienen entre sus funciones reparar tejidos y mantener la homeostasis<sup>81</sup>. Esta subpoblación de monocitos tiene como equivalente en los ratones el fenotipo Ly6C<sup>low70</sup>.

Bajo ciertas condiciones los monocitos sanguíneos son reclutados a los tejidos donde se diferencian en MΦ y células dendríticas<sup>83</sup>, donde modifican su fenotipo según los estímulos ambientales del sitio<sup>81</sup>, como productos microbianos, daño celular o actividad linfocitaria<sup>84</sup>. Algunas de estas condiciones son situaciones de inflamación ocasionadas por enfermedad, infecciones por ejemplo<sup>70</sup>, donde tienen funciones como células efectoras del sistema inmune, así como funciones de reparación y homeostasis<sup>82</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que los MΦ residentes de tejido no son derivados de la diferenciación de los monocitos si no que proceden de un precursor distinto, sin embargo, también se sabe que estos si contribuyen a la repoblación de estos MΦ en condiciones de homeostasis<sup>71</sup> en la piel<sup>85</sup> y el intestino<sup>86</sup>, y recientemente también se ha observado una repoblación parcial en el corazón<sup>87</sup> y los pulmones<sup>88</sup>.

Los MΦ son células con un tamaño un poco más grande, un núcleo más redondeado con nucléolos y un citoplasma más azulado, además de gránulos en el citoplasma<sup>77</sup>. Dentro de las poblaciones de MΦ, además de los MΦ derivados de monocitos, también existen los MΦ residentes de tejido cuya aparición es dependiente de orígenes distintos del hematopoyético<sup>89</sup>. Los MΦ comprenden un 10 – 15% del número total de células en el organismo en condiciones basales (pudiendo incrementar en condiciones de inflamación), presentando a su vez una elevada heterogeneidad dependientes del microambiente donde se desarrollen.

Los MΦ residentes reciben su nombre dependiendo del sitio anatómico donde se presentan, así por ejemplo están los osteoclastos (hueso), los MΦ alveolares (pulmón), microglía (SNC), histiocitos (tejido conectivo), células de Kupffer (hígado) y células de Langerhans (piel)<sup>90</sup>, sin embargo, las funciones de todos estos MΦ son las mismas en los distintos tejidos participando en el desarrollo del tejido, en la respuesta inmune celular innata contra patógenos y en mantener la homeostasis tisular eliminando células muertas y favoreciendo la reparación del tejido<sup>71</sup>.

En principio se consideró a los MΦ residentes de tejido con un origen derivado de monocitos, los cuales migraban a un sitio anatómico en particular bajo estímulos específicos y ahí se establecían<sup>91,92</sup>, sin embargo, dado que estas células proceden de progenitores embrionarios y se desarrollan en los tejidos antes del nacimiento conduciendo a los MΦ residentes de tejido<sup>93</sup>, y la habilidad que tienen algunos MΦ residentes de tejido para proliferar en el

adulto<sup>94</sup>, fueron la evidencia para establecer un origen ontogénico distinto al de los monocitos y los MΦ derivados de monocitos.

Según la hematopoyesis embrionaria el desarrollo de los MΦ inicia en la hematopoyesis primitiva en las primeras células progenitoras en el saco vitelino donde vía sistémica pueden migrar a varios tejidos, como el cerebro<sup>95</sup>, colonizando y manteniendo elevadas tasas de proliferación<sup>96,97</sup>. Una distinción muy marcada entre la hematopoyesis primitiva y la definitiva se basa en la expresión del factor de transcripción *Myb* en esta última, mientras que los MΦ derivados del saco vitelino presentan una diferenciación independiente del mismo, y en su lugar se activa la expresión de PU.1<sup>98</sup>, por lo que se establece que estos MΦ derivados del saco vitelino constituyen un linaje distinto al de la progenie derivada de la CMH.

Posteriormente, la hematopoyesis sigue en el hígado fetal donde esos progenitores hematopoyéticos del saco vitelino, y después por la CMH, continúan su proliferación y migración al resto de los órganos del individuo para continuar el establecimiento de estas células<sup>99</sup>. El hígado fetal se vuelve la fuente de la hematopoyesis definitiva productor de monocitos fetales circulantes durante la embriogénesis dando lugar a los MΦ residentes tales como las células de Kupffer en el hígado<sup>100</sup>, las células de Langerhans en la piel<sup>101</sup>, los MΦ alveolares en el pulmón<sup>88</sup> y generando los MΦ cardíacos<sup>87</sup>, los cuales expresan el factor de transcripción S100a4 a diferencia de los MΦ del saco vitelino, siendo únicamente la microglía los únicos MΦ independientes de esta diferenciación<sup>102</sup>, de manera que los monocitos fetales son la principal fuente de

precursores embrionarios para el establecimiento de los MΦ residentes<sup>89</sup>.

El bazo y la médula ósea son entonces colonizados vía circulación sanguínea por los progenitores hematopoyéticos que terminaran su diferenciación en estos sitios. Posterior al nacimiento y antes de la maduración del hueso, la hematopoyesis deja el hígado fetal y se establece completamente en la médula ósea<sup>71</sup>, sin embargo, aunque se establece que los MΦ residentes tienen un origen previo al hematopoyético, actualmente también se sabe que en algunos sitios como en la dermis<sup>85</sup>, el intestino<sup>103</sup> y el corazón<sup>104</sup> existe un reclutamiento y reemplazamiento constante por MΦ derivados de monocitos todo el tiempo en el adulto, actividad que puede ser potenciada en un contexto inflamatorio<sup>105</sup>.

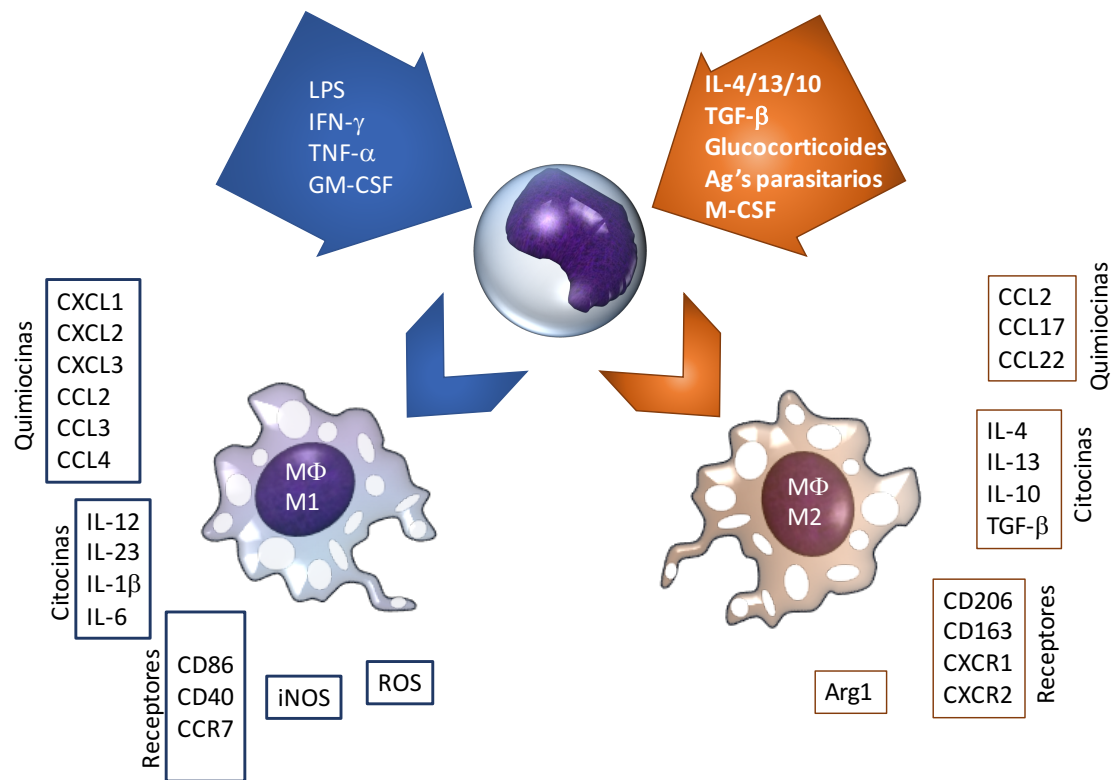
#### **1.4.2. Polarización y características de los MΦ M1/M2.**

Cuando los monocitos migran a los tejidos como resultado de un proceso infeccioso, son sometidos a una serie de eventos que finaliza con la diferenciación de estas células en respuesta al microambiente de diversos microorganismos<sup>106</sup> y/o la respuesta de citocinas generada por un tipo de respuesta inmunológica adaptativa Th1 o Th2<sup>83,107</sup>, lo que produce la expresión de diversos patrones de genes que conducen la producción de un perfil de citocinas característico junto con la expresión de marcadores de superficie igualmente particulares de una subpoblación de MΦ<sup>108</sup>. Las subpoblaciones de MΦ que derivan de monocitos son los MΦ referidos como los clásicamente

activados M1, derivados de los monocitos inflamatorios, y por su parte los monocitos antiinflamatorios son los precursores de los MΦ alternativamente activados M2<sup>107</sup>.

Los MΦ M1 se asocian con enfermedades autoinmunes, procesos inflamatorios e infecciones<sup>106</sup>, donde su participación se basa en promover una respuesta Th1 y mejorar su actividad antitumoral, bactericida<sup>84,109</sup> y contribuir en el combate contra parásitos intracelulares<sup>71</sup>. *In vitro* la activación de los monocitos en su polarización a MΦ M1 puede estar mediada por derivados de bacterias como el LPS o vestigios de peptidoglicano que son reconocidos por TLR, citocinas de carácter inflamatorio como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  o factores de crecimiento como el GM-CSF<sup>110,111</sup>. Las características particulares de los MΦ diferenciados como M1 tienen la producción de IL-12, IL-23, IL1 $\beta$  e IL-6, así como la eficiente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>71,110</sup> e intermediarios de nitrógeno, como el óxido nítrico (NO), mediante el catabolismo de la arginina a citrulina por acción de la sintasa de óxido nítrico (iNOS), los cuales tienen una participación microbicida importante<sup>71,111</sup>. La activación de los TLR o receptores de citocinas involucrados conllevan a la activación de los factores de transcripción de STAT1, la subunidad p65 de NF $\kappa$ B, PI3K y MAPK para dar lugar a los productos anteriormente mencionados<sup>84,106,107</sup>. Otras moléculas expresadas como resultado de la polarización a MΦ M1 son CD86, CD40, CCR7<sup>112</sup> y algunas quimiocinas como CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL3 y CCL4<sup>113</sup> (Figura 4).

Por su parte los MΦ M2 por su lado tienen una función más encaminada a la resolución de los procesos inflamatorios, la recuperación del tejido dañado, la tolerancia inmunológica, la promoción de una respuesta Th2, la participación en la eliminación de helmintos y la progresión tumoral<sup>84,106,109</sup>. Estos MΦ aparecen tras la estimulación de los monocitos no clásicos por citocinas propias de una respuesta Th2 como la IL-4 y la IL-13<sup>110</sup>, o antígenos cuya naturaleza tienen a favorecer este tipo de respuesta como antígenos parasitarios<sup>111</sup>; así mismo citocinas de carácter antiinflamatorio como IL-10, TGF-β o glucocorticoides también pueden favorecer una polarización M2<sup>71</sup>. La activación de esta diferenciación inducida por la IL-4 e IL-13 induce a la señalización de JAK/STAT mediada por STAT3 y STAT6<sup>84,106</sup>, las cuales finalmente favorecerán la expresión de IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β<sup>71,84</sup> y arginasa 1 (Arg1)<sup>107</sup>. La actividad de la Arg1 tiene como finalidad la producción de ornitina a partir de arginina, la cual puede estar involucrada en la promoción de la proliferación celular, la fibrosis y otras funciones de remodelación de tejido<sup>71,111</sup>. Además de las moléculas anteriormente mencionadas como producto del fenotipo M2, también hay expresión en la superficie de estos MΦ del receptor de manosa (CD206), del receptor scavenger (CD163)<sup>112</sup>, CCL2, CCL17, CCL22<sup>113</sup>, CXCR1 y CXCR2<sup>84</sup>. En los MΦ del tejido adiposo PPAR<sub>γ</sub> está constitutivamente expresado y entre sus funciones está la producción de IL-4 e IL-13, lo cual es un indicador que en los MΦ M2 este receptor pueda estar involucrado en la polarización<sup>107</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Condiciones de polarización de MΦ y su fenotipo producto de la diferenciación.**

#### 1.4.3. Plasticidad de los MΦ M1/M2 en la infección.

Con base en modelos murinos, actualmente se sabe que en ciertas zonas del organismo existe un recambio de los MΦ residentes en los cuales la subpoblación de monocitos Ly6C<sup>+</sup> se asocian a la adopción de un fenotipo inflamatorio en el proceso de diferenciación a MΦ, mientras que el fenotipo Ly6C<sup>-</sup> adquiere capacidades de reparación del tejido y exhibiendo la promoción de angiogénesis<sup>114,115</sup>, lo cual, dado el fenotipo funcional correspondería al establecimiento de MΦ M1 y M2 respectivamente<sup>116</sup>. Por otro lado se ha descubierto que los MΦ residentes básicamente comprenden un fenotipo de



MΦ M2, mientras que todos aquellos que sean reclutados de la circulación y se establezcan en el tejido adoptaran un fenotipo tipo M1 y/o M2 dependiendo de las condiciones de tejido o del microambiente que se encuentre en el momento<sup>71</sup>.

Entre las funciones ya descritas de los MΦ la implicación que tienen como reguladores de la respuesta inflamatoria en la enfermedad y la infección, los posiciona como el enlace entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa dado el monitoreo del microambiente en el que se encuentran dado la producción de citocinas y quimiocinas específicas<sup>117</sup>, los cuáles serán producto de estímulos igualmente específicos que diferenciarán los programas de activación transcripcionales para establecer el fenotipo específico de los MΦ<sup>71,118</sup>.

En principio la polarización de MΦ fue entendida como una analogía del proceso de polarización de las células Th1/Th2<sup>119,120</sup> en el que las células T orquestaban la diferenciación de los MΦ hacia el perfil M1/M2, sin embargo, dado que los MΦ son las primeras células en reconocer directamente a los patógenos<sup>121</sup> y estos pueden adoptar un fenotipo dependiente del estímulo y a su vez, deben entrar en contacto directo con los linfocitos T para permitir la proliferación de estos últimos, se piensa que realmente son los MΦ quienes inician con el proceso de polarización de las células T<sup>122,123</sup>. Por otro lado, a diferencia de los linfocitos, cuyo fenotipo es irreversible, en los MΦ se sabe que estos tienen la capacidad de adoptar un fenotipo distinto, inclusive una vez que ya se ha adoptado uno, gracias al microambiente de citocinas en el que se

encuentre; este proceso de cambios y reversión en el fenotipo de los MΦ es lo que recibe el nombre de plasticidad<sup>124,125</sup>.

En algunos análisis de perfiles transcripcionales se ha observado como las células del sistema inmune innato, entre ellos los MΦ, comparten un perfil de expresión cuando estas son expuestas a distintos patógenos<sup>126,127</sup> identificándose una sobreexpresión en genes asociados al perfil de MΦ M1, incluyendo las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ , y las quimiocinas CCL2, CCL5 y CXCL8, además de la expresión del receptor CCR7. Este efecto ha sido observado en modelos de infección con *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurim*, *M. tuberculosis* y algunas especies de *Chlamydia* sp<sup>128</sup>.

Por otro lado, algunos patógenos han desarrollado mecanismos de evasión con base en evitar el fenotipo pro-inflamatorio del MΦ M1, de manera que su sobrevivencia intracelular sea permisiva inhibiendo los procesos inflamatorios y microbicidas<sup>118</sup>. En este sentido se ha observado como en modelos de infección *Shigella flexneri*, produce un LPS hipoacetilado que evade el reconocimiento por TLR4 disminuyendo la producción de citocinas pro-inflamatorias en MΦ murinos<sup>129</sup>. Por su parte en la infección pulmonar en ratones con *Staphylococcus aureus* se observó cómo se induce la vía de Akt1 que favorece la actividad de SOCS1, inhibiendo a la vez la actividad de NF $\kappa$ B, conduciendo al MΦ pro-inflamatorio a un fenotipo con funciones microbicidas disfuncionales<sup>130</sup>. Mientras que *S. typhimurium* se ha relacionado con un incremento en la expresión de PPAR $\delta$  favoreciendo la reducción de los

productos microbianos de los MΦ, por lo que se sugiere que este efecto tiene como consecuencia la polarización de los MΦ hacia un fenotipo M2<sup>131</sup>.

En el contexto de la infección por *M. tuberculosis*, en las etapas tempranas los MΦ M1 forman parte de la respuesta celular en el hospedero<sup>128</sup>, promovidos por el microambiente pro-inflamatorio con base en la actividad del INF- $\gamma$ <sup>132</sup>, impulsando la producción de óxido nítrico, secreción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas e incrementando la actividad fagocítica lo cual en conjunto favorece la eliminación de las micobacterias evitando el establecimiento de la infección<sup>132-136</sup>. Sin embargo, *M. tuberculosis* posee mecanismos que evitan la polarización de los MΦ hacia el fenotipo M1, ya sea inhibiendo la activación dependiente del IFN- $\gamma$ , evitando la maduración de sus funciones o mediante la producción de ESAT-6 inhibiendo la activación de la vía NF $\kappa$ B y las vías de señalización de TLR-2<sup>128,134</sup>.

En un contexto opuesto los MΦ M2 favorecen el establecimiento de una respuesta tipo Th2<sup>135,137</sup> y se asocian a una pobre respuesta inflamatoria contra *M. tuberculosis*, sugiriendo que estas son células permisibles para el desarrollo intracelular del microorganismo<sup>138</sup>. Se ha descrito que *M. tuberculosis* influencia la expresión del factor tipo Kruppel 4 (KLF4) y otros factores transcripcionales que favorecen el programa de los MΦ M2 e inhibían el fenotipo M1<sup>139,140</sup>. Por otro lado, la polarización de los MΦ M2 también se ha sugerido como es establecido por la IL-10, cuando el LAM manosilado de *M. tuberculosis* es reconocido por el CD206 promoviendo su producción<sup>141</sup>. Aunque actualmente está bien establecido que los MΦ M2 son células que presentan las condiciones

ideales para la replicación de *M. tuberculosis* no está del todo elucidado el mecanismo que pueden llevar al establecimiento de este fenotipo.

### **1.5. Las proteasas como potenciales moduladores de la respuesta celular.**

Las proteasas, también conocidas como proteinasas o peptidasas, son proteínas con actividad enzimática cuya función es la hidrólisis del enlace peptídico<sup>142</sup> y en cuya clasificación estas se dividen según la posición del sustrato donde desempeñen su efecto, siendo las exopeptidasas las que realizan el corte en las posiciones terminales, o las endopeptidasas cuando estas se realizan en cualquier parte de la posición central<sup>143</sup>. A su vez, las exopeptidasas son divididas según el sitio donde desempeñan su función en aminopeptidasas y carboxipeptidasas, mientras que las endopeptidasas son re-categorizadas según el mecanismo catalítico en serin-, aspartil-, cisteín-, treonin-, glutamil- y metaloproteasas<sup>142,144</sup>.

Actualmente se ha identificado que en el genoma de mamíferos aproximadamente un 2% de los genes codifican para algún tipo de proteasas<sup>145</sup>, encontrándose solamente en el genoma humano 569 proteasas, las cuales se agrupan en 68 familias, y a su vez estas se distribuyen en 194 metaloproteasas, 176 serin proteasas, 150 cisteín proteasas, y finalmente 28 y 21 treonin proteasas y aspartil proteasas respectivamente<sup>146</sup>. Sin embargo, la producción de estas enzimas no se limita a los mamíferos encontrándose también en el resto del reino animal, plantas, bacterias, hongos y parásitos<sup>143</sup>. Según la base de datos de proteasas y sus inhibidores (MEROPS) solamente en

microorganismos como *Yersinia pestis*, *Legionella pneumophila* y el protista *Plasmodium falciparum*, los cuales son importantes patógenos humanos, se distinguen más de 100 genes asociados a algún tipo de proteasas<sup>147</sup>.

La mayoría de las proteasas son sintetizadas en una forma inactiva llamada zimógeno, los cuales adquieren su función hasta que son sometidos a un corte proteolítico u otro evento de activación<sup>148</sup>. En general las funciones que poseen estas enzimas se limitan a la hidrólisis del enlace peptídico, sin embargo las implicaciones de su actividad son muy diversas, encontrándose relacionadas en la modulación de interacciones proteína-proteína, generar, transducir y amplificar señales celulares, participar en el proceso de replicación y transcripción del ADN, en los eventos de diferenciación y proliferación celular, control del ciclo celular, remodelación y morfogénesis de tejidos, angiogénesis, neurogénesis, ovulación, fertilización, movilización de células madre, hemostasis y coagulación sanguínea, inflamación, modulación del sistema inmune, autofagia, necrosis, apoptosis, entre otros<sup>142,144,147</sup>.

Por su parte las bacterias y los microorganismos patógenos en general emplean a las proteasas como factores de virulencia favoreciendo el ambiente para su replicación, generando un daño directamente sobre el hospedero o manipulando el sistema inmune para su evasión, en cualquiera de los casos, estos son aspectos por lo que las proteasas microbianas son considerados blancos terapéuticos para su combate<sup>142,149</sup>. Algunos de los grupos de proteasas relacionados con bacterias patógenas comprenden a las proteasas Lon, Clp, HtrA y FtsH, siendo las enzimas ClpXP y ClpCP de las principales implicadas en la virulencia de las bacterias Gram positivas, mientras que en las

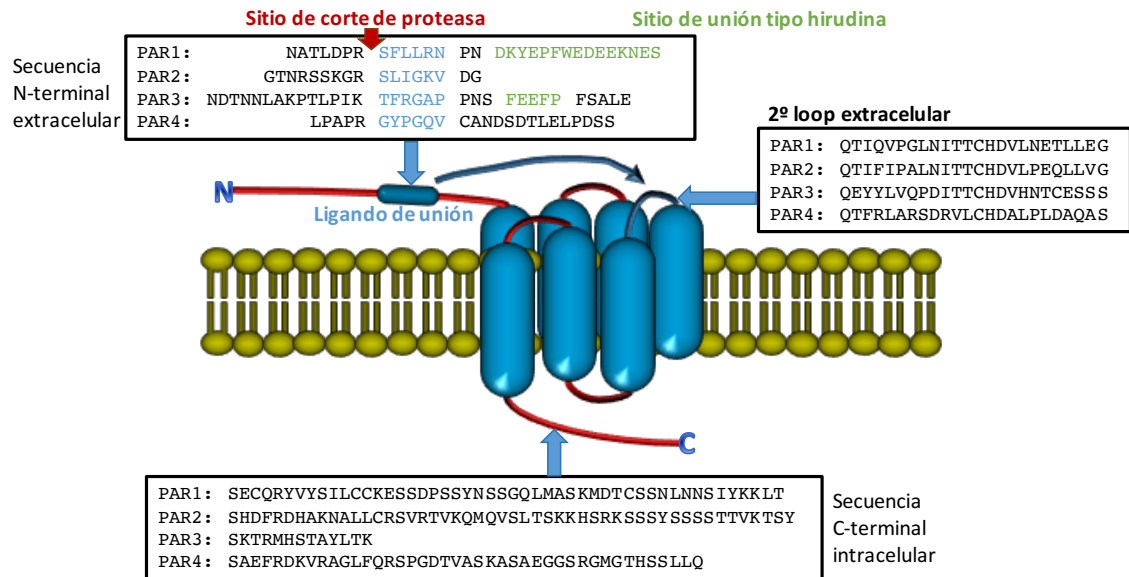
bacterias Gram negativas, se sabe que estas contribuyen a la patogénesis afectando procesos biológicos a través de la membrana<sup>150</sup>, sin embargo, los mecanismos más específicos sobre estas proteínas y su relación con el daño generado en el hospedero son aspectos que deben ser más estudiados para comprender mejor los aspectos fisiopatológicos de las proteasas microbianas en las infecciones.

Uno de los aspectos funcionales en los que se involucra la actividad enzimática de las proteasas es la activación de vías de señalización, la cual tiene la particularidad de ser un mecanismo de activación generalmente irreversible, y a través de la cual se activa una serie de receptores cuya particularidad es su mecanismo de activación: los receptores activados por proteasas (PARs)<sup>144</sup>.

#### **1.5.1. Los PARs y los efectos biológicos de su activación.**

Los PARs son una subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) conformados por 7 dominios transmembranales con un dominio amino terminal extracelular y su respectivo dominio carboxilo terminal intracelular<sup>151</sup>. Estos receptores comprenden una familia de cuatro miembros, con dominios de activación específicos, diferencialmente expresados en distintas células del organismo donde desempeñan funciones particulares y son activados por enzimas específicas. Los PAR1, PAR3 y PAR4 son activados por trombina, tripsina o catepsina G, mientras que PAR2 puede ser activado por tripsina, tripatasa y factor Xa de la coagulación<sup>152</sup>.

El mecanismo de activación de estos receptores por serin proteasas, las cuales rompen un enlace peptídico en el dominio extracelular, tiene como consecuencia la exposición de un nuevo dominio extracelular que es capaz de unirse a la segunda cresta extracelular del receptor y transducir una señal al interior de la célula<sup>153</sup>. En el receptor PAR1 se emplea la trombina como enzima modelo para su activación la cual corta el dominio extracelular en la posición R<sup>41</sup>↓S<sup>42</sup>FLLRN para exponer la secuencia de activación SFLLRN<sup>154</sup>, mientras que la tripsina, la cual resulta ser la enzima modelo para la activación del receptor PAR2, lleva a cabo su función en la posición R<sup>34</sup>↓S<sup>35</sup>LIGKV<sup>155</sup>; por su parte para activar al PAR3 la trombina realiza la escisión en la posición K<sup>38</sup>↓T<sup>39</sup>FRGAP<sup>156</sup> y en el PAR4, tanto la trombina como la tripsina, realizan la hidrólisis en R<sup>47</sup>↓G<sup>48</sup>YPGQV<sup>157,158</sup> (Figura 5).



**Figura 5. Representación de un PAR y sus dominios de activación.**

Tanto para la activación del PAR1, PAR2 y PAR4 existen péptidos sintéticos homólogos a la secuencia de activación reducidos a un mínimo de seis aminoácidos que tienen la capacidad de imitar el efecto de la secuencia de activación, denominados agonistas peptídicos<sup>159</sup>, sin embargo el uso de agonistas peptídicos del PAR3 es limitado, por el hecho de que este receptor presenta una región intracelular muy pequeña, insuficiente para la transducción de señal por sí mismo, y se ha demostrado que podría requerir de la dimerización con el PAR-4<sup>157</sup>.

Si bien es cierto que la trombina y la tripsina son las enzimas mayormente relacionadas a la fisiología de estos receptores, esto es debido a que en los procesos en los que se descubrieron, coagulación y digestión, los receptores PAR1 y PAR2 son los que estaban respectivamente involucrados<sup>160</sup>. Sin embargo, al día de hoy se ha descrito la participación de múltiples enzimas de diversos orígenes y con funciones igualmente particulares, por ejemplo, más allá de la trombina y su relación con PAR1, PAR3 y PAR4 en las plaquetas<sup>161</sup>, también hay evidencia de cómo los factores de coagulación VIIa y Xa actúan sobre el PAR1 y PAR2 de células endoteliales<sup>162,163</sup>. Por su parte la tripsina, además de activar al PAR2 también se sabe que actúa sobre el receptor PAR4<sup>164</sup>. Otra fuente muy importante de proteasas en el organismo son los leucocitos, dentro de las cuales destacan la triptasa de mastocitos que activa a PAR2<sup>165,166</sup>, la catepsina G y su efecto sobre PAR4<sup>167</sup> y la elastasa y la proteinasa 3 (PR3) que actúan sobre PAR2<sup>168,169</sup>, estas últimas tres enzimas producidas por los neutrófilos.



Las proteasas que activan a los receptores PARs no se limitan a aquellas producidas endógenamente por el organismo, existen varios reportes sobre el efecto que tienen serin proteasas producidas por microorganismos patógenos con diversos efectos dependientes del receptor sobre el que realizan su efecto. Por mencionar algunos ejemplos, el ácaro de polvo *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* producen las proteasas DerP1 y DerP9, las cuales estimulan la producción de citocinas en las vías respiratorias a través de la activación de PAR2<sup>170,171</sup>. Por su parte, el agente de la periodontitis, *Porphyromonas gingivallis*, es productor de la enzima RgpB que demostró inducir la producción de IL-6 mediante la activación de PAR1 y PAR2<sup>172,173</sup>.

Entre los patógenos bacterianos encontramos a *Pseudomonas aeruginosa* capaz de inducir la activación de NFκB a través de la vía de PAR1, PAR2 y PAR4<sup>174</sup>, pero al mismo tiempo su elastasa corta al PAR2 en un sitio distinto provocando el desarme del mismo y la fallida transducción de una señal al interior de la célula<sup>153</sup>; por su parte en *Helicobacter pylori* se observó que alguna de sus proteasas inducían la producción de la quimiocina IL-8 en las células del epitelio gástrico dependientes de la activación del PAR2<sup>175</sup>, al igual que *Serratia marcescens* en células pulmonares, con la adicional producción de IL-8<sup>176</sup>. Finalmente, en el hongo *Alternaria fungus* se describió la activación de PAR2 por una aspartil proteasa<sup>177</sup>.

Las funciones en las que se involucra la activación de cualquiera de los miembros de esta familia de cuatro receptores será dependiente de la célula, de

la proteasa y del receptor que esté implicado, por lo que la cantidad de efectos es muy variada. Uno de los efectos mejor estudiados en la activación de los PARs es la agregación plaquetaria producto del efecto de la trombina sobre PAR1 y PAR4 en los trombocitos humanos<sup>178</sup>, aunque es un efecto que también se ha atribuido al PAR4 cuando es cortado por la catepsina G<sup>167</sup>. Por otro lado, cuando los efectos observados en el tracto gastrointestinal se han estudiado se han observado implicaciones en el transporte de iones a cargo del receptor PAR1 y PAR2<sup>179–181</sup>, la activación de las contracciones en el musculo gástrico por PAR1 y PAR2, la regulación de las secreciones pancreáticas, salivares y gástricas cuando se activa al PAR2<sup>182</sup> y la inducción en la producción de prostaglandinas en los enterocitos<sup>183</sup> y la secreción de moco gástrico<sup>184</sup>, igualmente con la activación del PAR2. Por su parte en las vías respiratorias las células epiteliales expresan a los receptores PAR1, PAR2 y PAR4, los cuales son productores de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 y la IL-8, además de prostaglandina E2, cuando estos son activados. En el sistema nervioso la activación del PAR1 puede favorecer la supervivencia de las neuronas y los astrocitos, cuando éstas se encuentran sometidas a condiciones ambientales desfavorables como la hipoglicemia o el estrés oxidativo, lo que finalizaría en muerte celular<sup>185</sup>; sin embargo, si la exposición a los agonistas del PAR1 es por un tiempo prolongado o en altas concentraciones lo que se obtiene en neurodegeneración por apoptosis<sup>186</sup>. PAR4 es otro receptor cuya activación podría resultar perjudicial para el cerebro, al promover la inflamación con la producción de TNF- $\alpha$  por la microglía<sup>187</sup>. Por su lado, en la piel se ha

relacionado la activación del PAR2 con la pigmentación debido a que la activación de este estimula la fagocitosis de los melanosomas por parte de los queratinocitos<sup>188,189</sup>, además de ser un promotor de proliferación celular en estas mismas células<sup>190,191</sup> y en fibroblastos<sup>192</sup> e inducir angiogénesis<sup>193</sup> con la activación del PAR1, y finalmente, favorecer la expresión IL-6, IL-8 y GM-CSF en queratinocitos tras la activación de PAR1 y PAR2, lo que indica que mediante estas vías se modula el microambiente de citocinas en la epidermis<sup>194,195</sup>.

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que en la actualidad representa un serio problema a nivel mundial, considerándose como la enfermedad infecciosa con la mayor tasa de mortalidad. Entre los principales aspectos que persisten por esclarecer en esta enfermedad es el desarrollo fisiopatológico que conlleva el establecimiento y la progresión de esta enfermedad y es en este contexto donde la participación que tiene el sistema inmune para mantener un combate efectivo cobra importancia.

Diversos estudios señalan que es necesario el establecimiento de una respuesta pro-inflamatoria para contender con este microorganismo, ya que es ahí donde se observa una disminución en la carga bacteriana, y a la inversa, cuando el predominio corresponde a las citocinas del tipo Th2, indicativo de una respuesta anti-inflamatoria la infección progresa<sup>8</sup>. Es en este sentido los MΦ M1 corresponden al fenotipo con las características que favorecen el combate de la infección al ser las células con la capacidad de eliminar a las micobacterias, mientras que los MΦ M2 ofrecen el ambiente intracelular propicio para la

replicación del microorganismo al ser un fenotipo anti-inflamatorio asociado a la progresión de la enfermedad<sup>69</sup>.

Por su parte el granuloma, aunque no es una estructura que destruye al microorganismo, si es una estructura que apoya el control y la contención de la infección<sup>196</sup>. En estos mismos complejos celulares se ha descrito como esos MΦ centrales en los cuales se estaba llevando el proceso de replicación adquieren un fenotipo del tipo M2<sup>197</sup>. En este sentido, se ha observado que en modelos murinos de tuberculosis en los cuales se formaron granulomas necrotizantes y caseosos se encontró la presencia de la serin proteasa catepsina G. Cuando en estos mismos experimentos se implementó un inhibidor de serin proteasas los granulomas sufrieron un efecto en cuanto al desarreglo de su estructura lo que favoreció que las micobacterias pudieran viajar diseminándose por el organismo y estableciéndose en órganos específicos<sup>198</sup>.

Lo anterior sugiere que la catepsina G puede desempeñar un papel protector en el proceso infeccioso, por lo que entonces, resulta interesante estudiar el efecto que tienen las proteasas en el contexto de la tuberculosis. Sin embargo, recientemente se descubrió que la activación de los PARs promovía la producción de distintas citocinas cuando se activaban células mononucleares de sangre periférica (CMSP), y aunque se sugirió la adopción del fenotipo de MΦ M2a<sup>199</sup>, habría que realizar ensayos con una especificidad mayor que sugieran el efecto que tienen estos receptores sobre los MΦ.

## CAPÍTULO 3

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una infección pulmonar crónica ocasionada por el agente *M. tuberculosis*, cuya importancia en la salud pública es a nivel mundial dado que se encuentra infectando asintóticamente a más de un tercio de la población mundial y siendo la causa de muerte de más de dos millones de individuos al año, lo que la sostiene enfermedad infecciosa con mayor mortalidad en el mundo. Actualmente, la complejidad de la enfermedad se incrementa con la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y multi resistentes a los tratamientos convencionales contra la tuberculosis, por lo que profundizar en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad es una forma de indagar en la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden al combate de esta enfermedad.

La respuesta inmunológica en la tuberculosis es un aspecto bastante estudiado del cual a la fecha se sabe que se requiere del establecimiento de una respuesta pro-inflamatoria, la cual dada su actividad microbicida es promotora de la resolución de la infección, e inclusive, se ha visto que en aquellos pacientes en los que el tratamiento farmacológico es efectivo, se acompaña de un re-establecimiento de este tipo de respuesta. En contraparte,

también se sabe que bajo ciertas condiciones de inmunocompromiso por parte del hospedero o de hipervirulencia de las cepas que se encuentren infectando, estas pueden ser favorecedoras para la adopción de un microambiente en el cual *M. tuberculosis* pueden encontrar un nicho para permitir su replicación.

Es bien sabido que los MΦ son la célula blanco para la replicación de la micobacteria, sin embargo, también se sabe que en aquellas células que presentan un fenotipo asociado a la respuesta pro-inflamatoria o Th1 como los MΦ M1, este proceso de adaptación no puede llevarse a cabo dado las condiciones desfavorables para la bacteria. Por otro lado, el fenotipo ideal de MΦ es aquel en el que estas características inflamatorias tan agresivas no se presentan, siendo el MΦ M2 el fenotipo ideal. El fenotipo de MΦ M2 está asociado a aquel ambiente anti-inflamatorio Th2 o regulador, el cual a su vez también se asocia a la forma progresiva de la enfermedad.

Un mecanismo propuesto anteriormente capaz de participar en los procesos de regulación de la respuesta inmune son los PARs, los cuales se caracterizan por ser activados por el corte proteolítico de serin proteasas y que se expresan diferencialmente en todas las células entre ellas los MΦ, por lo que conocer la implicación que tienen estos receptores tanto en la polarización de MΦ como en la respuesta inmune específica, persiste como un tema interesante que podría incrementar el entendimiento de la enfermedad.

## CAPÍTULO 4

### JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad en la cual el control de la infección requiere de una respuesta celular Th1, sin embargo, tanto en la infección humana como en modelos experimentales se ha demostrado que la polarización hacia el fenotipo Th2 en las fases avanzadas está asociada a mal pronóstico o muerte en los modelos experimentales.

Una característica asociada al control de la infección es la preservación de la integridad de los granulomas, en los que se ha demostrado que la actividad de serin proteasas juegan un papel determinante. Actualmente se desconoce si estas serin proteasas actúan a través de los receptores PARs (1-4) en la modulación de la activación de los MΦ, y su potencial impacto sobre la diferenciación M1/M2 y en el perfil de la respuesta Th1/Th2.

Por lo anterior, se propone dilucidar el papel que juegan dichos receptores mediante su activación específica con trombina y tripsina en un modelo *in vitro* de activación de respuesta Th1.



## **CAPÍTULO 5**

### **OBJETIVOS**

#### 5.1 Objetivo general.

Evaluar la participación de los PARs en la polarización de MΦ M1/M2 y su efecto sobre la repuesta Th1 en un modelo *in vitro* de activación con CFP de *M. tuberculosis*.

#### 5.2 Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto de la activación de los PARs sobre la diferenciación terminal a MΦ M1/M2 mediante su activación específica con trombina y tripsina.
2. Evaluar el efecto de la activación de los PARs sobre la modulación del perfil de citocinas Th1/Th2 mediante su activación específica con trombina y tripsina.

## **CAPÍTULO 6**

### **HIPÓTESIS**

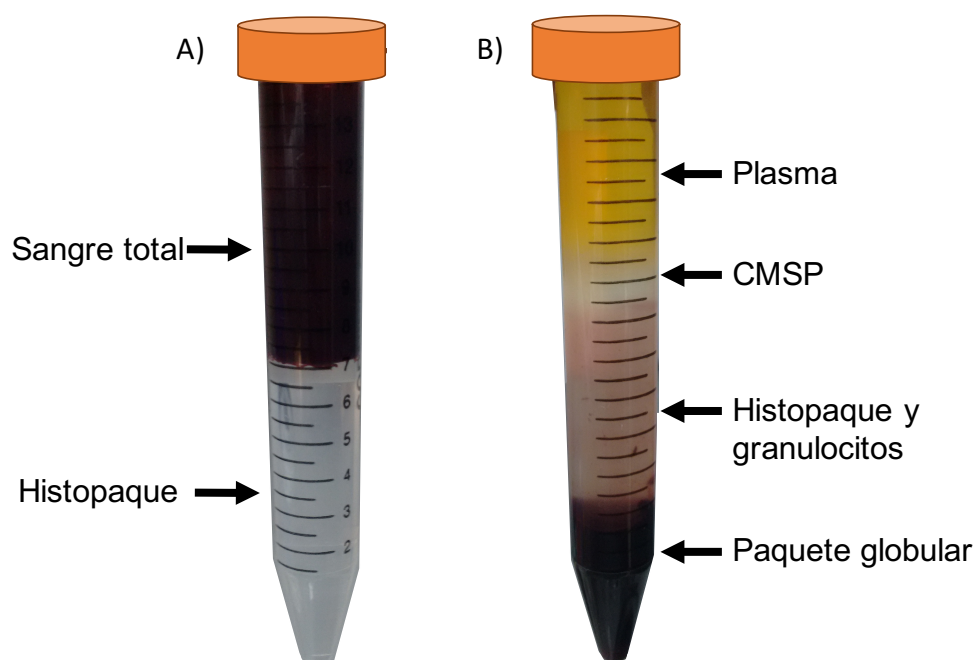
La activación específica de los PARs en los monocitos modula la diferenciación terminal a MΦ M2, y polariza la respuesta de las células T colaboradoras hacia el perfil Th2.

## **CAPÍTULO 7**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **7.1. Purificación de monocitos.**

Se obtuvieron muestras de sangre de individuos PPD positivos. Mediante punción venosa se obtuvieron 28 mL de sangre venosa los cuales fueron utilizados para preparar cuatro gradientes de densidad; en tubos falcon de 15 mL se dispusieron de 7 mL del medio histopaque y sobre este el mismo volumen de sangre (relación 1:1) (Figura 6A). Se centrifugaron a 800 *g* por 25 minutos, con una aceleración de 9 y desaceleración de 3. Una vez que las muestras se separaron (Figura 6B), con el uso de una pipeta Pasteur se retiró toda la primera fase del tubo la cual correspondía al plasma sanguíneo para entonces, con cuidado de no contaminar con la siguiente fase, se recolectó la segunda fase del gradiente correspondiente con las CMSP; las cuatro fases de CMSP se colectaron en un nuevo tubo falcón de 15 mL para entonces hacer un lavado con buffer de fosfatos salino (PBS) estéril, centrifugando a 300 *g* por 10 minutos, 9 de aceleración y desaceleración.



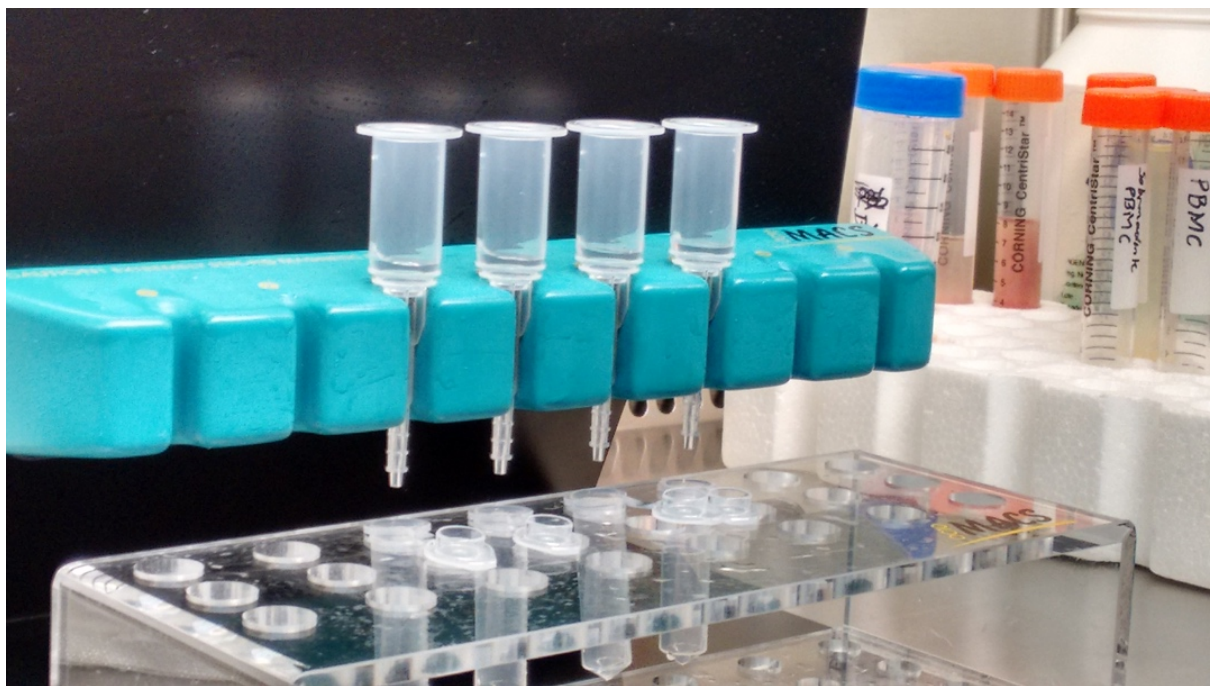
**Figura 6. Gradiente de densidad de histopaque.** Gradientes antes de centrifugar (A) y después de la centrifugación (B).

Una vez que la fracción de CMSP se purificó, se realizó la cuantificación de la viabilidad celular con el uso de azul tripano haciendo una dilución 1:100 y contando con una cámara de Neubauer (microscopio). Aunque la concentración celular es dependiente del individuo, se requirió una viabilidad superior del 90 % para continuar el ensayo.

Según el resultado obtenido en el conteo de viabilidad celular, se procedió a la preparación de las muestras para la purificación por inmunomagnetismo (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó un ajuste celular en una concentración de  $4 \times 10^7$  CMSP/mL en un volumen final de 80  $\mu$ L; en esta suspensión 40  $\mu$ L correspondieron a perlas magnéticas conjugadas con el anticuerpo anti-CD14,

marcador específico para la purificación de monocitos. El volumen final se alcanzó con el buffer de elución (PBS pH 7.2, albúmina sérica bovina (ASB) 0.5 % y EDTA 2 mM). De esta solución celular se prepararon 10 muestras para emplear 5 columnas y hacer uso dos veces de cada una. Las muestras se incubaron a 4 °C por 15 minutos. Posteriormente se resuspendieron con un mililitro de buffer de elución y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos a 4 °C. Las muestras se decantaron y se resuspendieron en 500 µL de buffer de elución previo al paso por las columnas.

El sistema de inmunomagnetismo debía estar previamente frío para su uso. Una vez instalado se dispusieron de cinco columnas sobre el magneto para la purificación, las cuales fueron equilibradas con 500 µL de buffer de elución antes del paso de la muestra (Figura 7).



**Figura 7. Representación del sistema de inmunomagnetismo.**

Una vez que se instaló el sistema se procede con la elución de las muestras colectando la selección negativa o fase uno (F1) de la misma, la cual correspondió a aquellas células mononucleares CD14<sup>-</sup> (linfocitos). Antes de obtener la selección positiva de la muestra se realizaron tres lavados en la columna con 500 µL del buffer de elución para una mejor purificación de la fase de interés; la elución de los tres lavados es la fase dos (F2). Finalmente, las columnas son retiraron del magneto, y utilizando un tubo falcón estéril de 15 mL, el embolo de las columnas y 300 µL de buffer de elución, se recolectaron la fase tres (F3) de las muestras, correspondientes con la fracción de células CD14<sup>+</sup> o monocitos.

## **7.2. Evaluación morfológica de células CD14<sup>+</sup> por tinción de Giemsa.**

Como primera evaluación de las células purificadas CD14<sup>+</sup> se realizó una observación microscópica de las mismas utilizando la tinción de Giemsa. Con un volumen de 10 µL se realizó un extendido en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. El frotis se fijó con metanol absoluto, cubriendo todo el extendido, y se dejó secar al aire; el colorante de Giemsa se colocó cubriendo todo el extendido y dejándolo actuar por 15 minutos. Posterior a este tiempo el portaobjetos se lavó con agua corriente y se secó al aire. La observación de la laminilla se realizó en microscopio óptico enfocado en 10X y observado en 100X.

### 7.3. Evaluación de la expresión de marcadores de monocitos por citometría de flujo.

#### 7.3.1. Tinción directa.

Para comprobar la pureza de las células obtenidas en el procedimiento anterior se realizó la cuantificación de marcadores específicos de monocitos empleando citometría de flujo. Se emplearon anticuerpos primarios específicos en las combinaciones como se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.**  
**Combinaciones de marcajes empleados en la determinación de pureza de monocitos por citometría de flujo.**

<b>Marcaje</b>	<b>Anticuerpos</b>	<b>Fluoróforos</b>
<b>1</b>	Control sin tinción	
<b>2</b>	Anti-CD14	FITC
<b>3</b>	Anti-CD14	PE
<b>4</b>	Anti-CD14	PE
	Anti-CD11b	FITC
<b>5</b>	Anti-CD14	PE
	Anti-CCR7	FITC
<b>6</b>	Anti-CD14	PE
	Anti-CD206	FITC

Los marcajes 1, 2 y 3 fueron los controles endógenos para el ensayo, el marcaje 4 es el que indicó el porcentaje de purificación dado que es el doble marcaje específico para monocitos, y por último, el marcaje 5 y 6 reveló los

niveles basales de los considerados posteriormente como marcadores de diferenciación.

De los monocitos purificados se hizo un ajuste celular a una concentración de  $1 \times 10^6$  monocitos/mL y se tiñeron con 5  $\mu$ L del respectivo anticuerpo; en caso de un doble marcaje se dispuso de los dos anticuerpos a la vez. Se homogenizó la muestra con los anticuerpos y se incubó en oscuridad por 30 minutos a 4 °C. Posterior a la incubación se hicieron dos lavados con 200  $\mu$ L de buffer PBS/ASB 1 %, en cada ocasión, centrifugando a 1,500 rpm por 15 minutos a 4 °C. Después del segundo lavado el botón celular se resuspendió en 200  $\mu$ L de paraformaldehído (PFA) al 4 % y se incubó a 4 °C por 15 minutos. El PFA se retiró haciendo un lavado más con PBS/ASB 1 % en las mismas condiciones de centrifugación, resuspendiendo las células en 200  $\mu$ L de PBS/ASB 1 % y resguardándolas a 4 °C hasta su evaluación.

### **7.3.2. Tinción indirecta.**

El uso de una tinción indirecta es para la determinación de los niveles de expresión de los PARs en monocitos, y para asegurar que pertenecen a esta población celular se tiñeron en conjunto con el marcador específico CD14. Para esta tinción los anticuerpos anti-PAR1, anti-PAR2 y anti-PAR3 que no estaban conjugados con un fluoróforo, se requirió del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE. Las combinaciones de los marcajes se muestran en la tabla 2.



**Tabla 2.**

**Combinaciones de marcajes empleados en la determinación de los niveles de expresión de los PARs en monocitos.**

<b>Marcaje</b>	<b>Anticuerpos</b>	<b>Fluoróforos</b>
<b>1</b>	Control sin tinción	
<b>2</b>	Anti-CD14	FITC
<b>3</b>	Anti-CD14	PE
<b>4</b>	Anti-CD14	FITC
	Anti-PAR1 + Anti-ratón	PE
<b>5</b>	Anti-CD14	FITC
	Anti-PAR2 + Anti-ratón	PE
<b>6</b>	Anti-CD14	FITC
	Anti-PAR3 + Anti-ratón	PE

En este procedimiento se utilizó la misma concentración celular utilizada en la tinción directa. El protocolo de tinción inició con la adición de 5  $\mu$ L del anticuerpo indirecto primario, la homogenización con la muestra e incubación por una hora a 4 °C. Posterior a la incubación se realizaron dos lavados con PBS/ASB 1 % y se centrifugaron a 1,500 rpm por 15 minutos a 4 °C. Después se añadieron 2.5  $\mu$ L del anticuerpo indirecto secundario y se incubó por 45 minutos en oscuridad a 4 °C. Transcurrido este tiempo se hicieron tres lavados con 300  $\mu$ L del buffer PBS/ASB 1 %, con las mismas condiciones de centrifugación.

La siguiente fase del protocolo fue la tinción con el anticuerpo directo anti-CD14, en el cual se añadieron 5  $\mu$ L del anticuerpo y se incubaron por 30 minutos en oscuridad a 4 °C. Se hicieron dos lavados con PBS/ASB 1 % y se repitieron las condiciones de centrifugación. Después de la segunda

centrifugación las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PFA 4 % por 15 minutos; el PFA se lavó con 200  $\mu$ L de PBS/ASB 1 % y se centrifugó 15 minutos a 1,500 rpm en refrigeración. Finalmente, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS/ASB 1 % y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

#### **7.4. Observación de marcadores de monocitos por inmunofluorescencia.**

##### **7.4.1. Expresión de marcadores CD14/CD11b en monocitos.**

Empleando los mismos anticuerpos que se utilizaron en citometría de flujo se realizaron observaciones por inmunofluorescencia para observar la expresión de los marcadores previamente cuantificados. Los monocitos purificados se fijaron con PFA 4 % como se mencionó anteriormente y se extendieron en un frotis secándose con calor para permitir la adherencia al portaobjetos. Las laminillas se colocaron en cámara húmeda para realizar la tinción, donde se inició con un bloqueo con buffer PBS/ASB 3 % por 15 minutos. Posteriormente se realizó la permeabilización con 50  $\mu$ L de tritón 100-X 2 % por 15 minutos a temperatura ambiente. El tritón se lavó dos veces con el buffer de bloqueo y entonces se añadieron 25  $\mu$ L de los anticuerpos anti-CD14 (PE) y anti-CD11b (FITC) (dilución 1:250) a cada una las muestra. Las muestras con los anticuerpos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por una hora. Posteriormente las muestras se lavaron dos veces con el buffer de bloqueo, se añadió el colorante para ácidos nucleicos DAPI en dilución 1:100 y se incubó

por 15 minutos más, para finalizar con dos lavados y la fijación de las laminillas con 10 µL de glicerol 70 % para su observación.

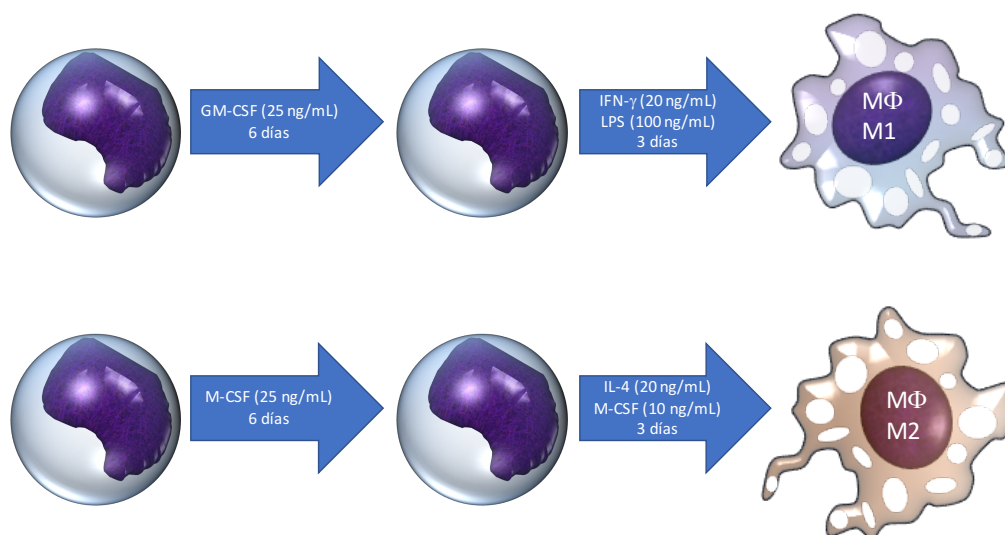
#### **7.4.2. Expresión de PARs en monocitos.**

La observación de los PARs por inmunofluorescencia se realizó empleando los mismos anticuerpos que en citometría de flujo y al igual que en el procedimiento anterior se realizó un frotis de monocitos fijados en PFA 4 % para comenzar con la inmunofluorescencia. Las células fueron bloqueadas con ASB 3 % por 15 minutos y después se permeabilizaron con 50 µL de tritón 100-X, igualmente por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con buffer de bloqueo posteriormente, y entonces se añadieron 50 µL del anticuerpo primario anti-PAR1, anti-PAR2 y anti-PAR3 en muestras independientes (dilución 1:100), y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados con buffer de bloqueo y entonces se adicionaron 50 µL del anticuerpo secundario anti-ratón (FITC) en dilución 1:1000; las laminillas se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente por 45 minutos. Se realizaron dos lavados nuevamente y se dispusieron de 10 µL de DAPI, incubándose en oscuridad por 15 minutos para finalmente realizar dos lavados más y fijar con 10 µL de glicerol 70 %.

#### **7.5. Protocolo de diferenciación de MΦ M1/M2.**

### 7.5.1. Diferenciación convencional de MΦ.

Para el estudio de la polarización primero se optó por el montaje de un modelo de diferenciación de monocitos a MΦ empleando estímulos clásicos, siendo estos el IFN- $\gamma$  y el LPS bacteriano para MΦ M1 y la IL-4 para MΦ M2<sup>200,201</sup>. En la Figura 8 su muestra una representación en el tiempo del protocolo de diferenciación.



**Figura 8. Esquema del protocolo de diferenciación en el tiempo para MΦ M1 y MΦ M2.**

Brevemente, de los monocitos previamente purificados se realizó un ajuste de células a una concentración de  $2 \times 10^6$  monocitos/mL diluyendo las células en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF), piruvato de sodio,  $\beta$ -mercaptoetanol, aminoácidos esenciales y antibióticos. La suspensión celular se distribuyó en placas de 24 pozos para la recuperación de

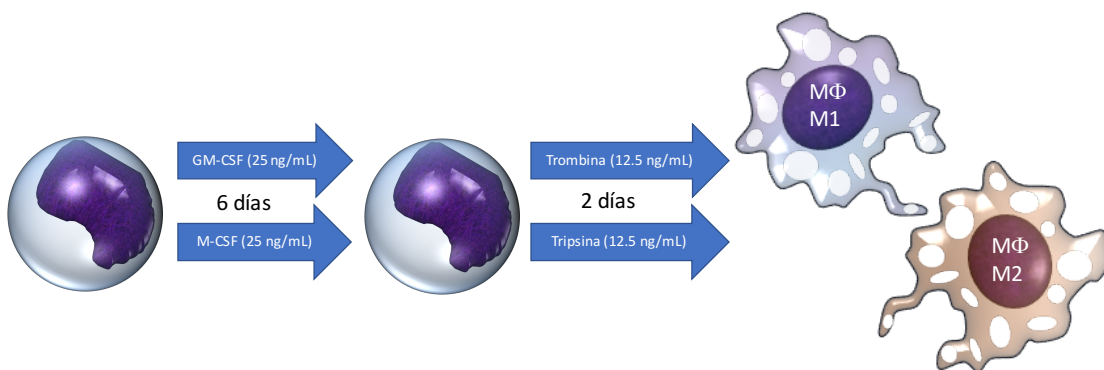
sobrenadantes y la posterior cuantificación de citocinas por ensayos de ELISA y en placas de 8 pozos para permitir la adherencia de las células a la laminilla y observar la expresión de los marcadores de diferenciación por inmunofluorescencia; la distribución de las células en cada caja fue de 250  $\mu$ L y 50  $\mu$ L, por pozo, respectivamente. Las células en las placas de cultivo se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, por dos horas para permitir la adherencia a la placa. Una vez que transcurrió el periodo de incubación las células se sometieron a un proceso de pre-diferenciación en el cual aquellas que tienen como objetivo diferenciarse a M $\Phi$  M1 se trataron primero con el GM-CSF, y las que serán diferenciadas a M $\Phi$  M2 con el M-CSF; en ambos casos se empleó una concentración de 25 ng/mL y el tiempo de pre-diferenciación fue de 6 días en las mismas condiciones de incubación.

Una vez que transcurrió el tiempo de incubación los sobrenadantes de la pre-diferenciación fueron colectados y resguardados a -20 °C para su evaluación por ELISA. En los pozos donde se tenían a las células en tratamiento, el medio fue sustituido por RMPI suplementado, pero ahora adicionado con los estímulos para la diferenciación. Para los M $\Phi$  M1 el medio de cultivo contenía IFN- $\gamma$  en una concentración de 40 ng/mL y 200 ng/mL de LPS, mientras que los cultivos para M $\Phi$  M2 fueron estimulados con 40 ng/mL de IL-4 y 20 ng/mL de M-CSF. Las placas de cultivo con el nuevo medio, fueron reintroducidas a incubación por tres días bajo las mismas condiciones. Finalizado el proceso, los sobrenadantes fueron colectados, centrifugados para eliminar restos celulares y congelados a -20 °C hasta su evaluación por ELISA,

mientras que las células de las placas de ocho pozos se fijaron con PFA 4 % por 15 minutos, después de esto se lavaron con PBS y se mantuvieron suspendidas en PBS estéril hasta la realización de inmunofluorescencia.

### 7.5.2. Diferenciación de MΦ con el empleo de serin proteasas.

Una vez que se estableció un modelo de diferenciación en el cual la estimulación sea por agonistas que clásicamente conducen a los fenotipos M1 y M2, se procedió entonces a probar la activación de los PARs utilizando trombina y tripsina para conocer el efecto sobre los monocitos previamente purificados<sup>199</sup>. En la Figura 9 se muestra un esquema que representa el protocolo de diferenciación.



**Figura 9. Esquema del protocolo de diferenciación en el tiempo empleando trombina y tripsina.**

Muy similar al protocolo de diferenciación anterior, para llevar a cabo este ensayo de diferenciación se realizó un ajuste de células a una concentración de  $2 \times 10^6$  monocitos/mL y se sembraron en placas de 24 pozos y placas de 8

pozos, en los mismos volúmenes y con la misma finalidad como anteriormente se describió. Las células en sus placas de cultivo se incubaron por dos horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, para permitir la adherencia celular. Posteriormente se inició con el mismo protocolo de pre-diferenciación empleando GM-CSF y M-CSF, con una concentración de 25 ng/mL, por 6 días y en las mismas condiciones de incubación.

Posterior a la incubación, los sobrenadantes de la pre-diferenciación fueron colectados y almacenados a -20 °C, y en los pozos de cultivo se sustituyó el medio de cultivo ahora con uno adicionado con los estímulos con base en las proteasas trombina y tripsina, pero además empleando a los agonistas y antagonistas de los receptores PARs como controles de especificidad de activación de los mismos, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.**  
**Tratamientos aplicados en el modelo de diferenciación**  
**con base en la activación de los PARs.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Factor de crecimiento</b>	<b>Estimulo</b>
<b>1</b>	---	---
<b>2</b>	GM-CSF	---
<b>3</b>	M-CSF	---
<b>4</b>	GM-CSF	Trombina
<b>5</b>	GM-CSF	Tripsina
<b>6</b>	M-CSF	Trombina
<b>7</b>	M-CSF	Tripsina
<b>8</b>	GM-CSF	Agonista PAR1
<b>9</b>	GM-CSF	Agonista PAR2

<b>10</b>	M-CSF	Agonista PAR1
<b>11</b>	M-CSF	Agonista PAR2
<b>12</b>	GM-CSF	Antagonista PAR1
<b>13</b>	GM-CSF	Antagonista PAR2
<b>14</b>	M-CSF	Antagonista PAR1
<b>15</b>	M-CSF	Antagonista PAR2

El tratamiento 1 fue el control basal, donde se emplearon células que no recibieron ningún estímulo; el tratamiento 2 y 3 correspondió a los sobrenadantes de la pre-diferenciación los cuales fueron controles del efecto de los factores de crecimiento en la diferenciación; los tratamientos 4-7 evaluaron el efecto de las enzimas con un factor de crecimiento determinado; finalmente, los tratamientos 8-11 y 12-15 fueron los controles de activación e inactivación de los PARs con el uso de los agonistas y antagonistas de los receptores, respectivamente.

Tanto la trombina como la tripsina fueron aplicadas en una concentración de 12.5 ng/mL, mientras que el agonista de PAR1 como el de PAR2 en una concentración de 10  $\mu$ M. Para la administración de los antagonistas de los receptores, el del PAR1 se añadió en una concentración de 5  $\mu$ g/mL y el de PAR2 en 50  $\mu$ g/mL, en un volumen de 250  $\mu$ L y 50  $\mu$ L para las placas de 24 y 8 pozos respectivamente. Se realizó una incubación de 30 minutos y después de la misma se añadió el estímulo de trombina y tripsina, ahora en una concentración de 25 ng/mL en el mismo volumen de los antagonistas, para que en una relación 1:1 la concentración de las enzimas fuera diluida en una concentración final de 12.5 ng/mL. Las placas de cultivo fueron finalmente



incubadas por 48 h en las mismas condiciones, para entonces recolectar los sobrenadantes utilizados en los posteriores ensayos de ELISA y las células de las placas de 8 pozos se fijaron con PFA 4 % para su observación por inmunofluorescencia, ambos procedimientos son realizados justamente como se menciona en el protocolo anterior.

#### **7.6. Cuantificación de IL-12 e IL-4 por ELISA como marcadores de diferenciación de MΦ M1/M2.**

Como parte de la evaluación sobre la diferenciación de los monocitos a MΦ en ambos modelos, se determinó la cuantificación de citocinas de los sobrenadantes del cultivo empleando a la IL-12 como marcador de polarización hacia el fenotipo de MΦ M1, y a la IL-4 como del fenotipo de MΦ M2. Estas determinaciones se hicieron por ensayos de ELISA tipo sándwich siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, en placas de 96 pozos se realizó una sensibilización de la misma con el anticuerpo de captura para cada citocina, el cual estaba diluido en un buffer de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9.5), con una aplicación en cada pozo de 100  $\mu\text{L}$ . Las placas con el anticuerpo de captura se incubaron a 4 °C toda la noche.

En el segundo día del ensayo el anticuerpo de captura se retiró y se realizaron tres lavados con buffer PBS:tween-20 aplicando 250  $\mu\text{L}$  por pozo, y golpeando la placa contra la superficie después del último lavado para asegurar

el retiro de todo líquido. Las placas fueron posteriormente bloqueadas con solución de ASB 0.5 % por una hora, añadiendo 200 µL de la solución por cada pozo. Se repitieron los mismos tres lavados después del bloqueo para entonces colocar 100 µL por pozo de las muestras, controles y estándares, diluidos previamente tres veces en la misma solución de ASB 0.5 %. La placa se selló e incubó a temperatura ambiente toda la noche.

La placa ahora se lavó cinco veces con el mismo buffer y en el mismo volumen, para entonces aplicar 100 µL de la solución detectora, la cual consistió en el anticuerpo de detección de cada citocina y la enzima HRP; la placa se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron siete lavados más y seguido de esto se adicionaron 100 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por pozo y se incuban en oscuridad por 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y entonces se realizó la lectura de la absorbancia de cada pozo en un lector de microplaca a 450 nm con una corrección de la longitud de onda de 570 nm. En la tabla 4 se resumen las diluciones de los anticuerpos empleados y las concentraciones de las curvas estándar.

**Tabla 4.**

**Diluciones de anticuerpos y concentraciones de estándares en la determinación de IL-12 e IL-4 por ELISA tipo sándwich.**

<b>Citocina</b>	<b>Anticuerpo de captura (dilución)</b>	<b>Anticuerpo de detección (dilución)</b>	<b>Curva estándar (concentraciones [pg/mL])</b>
<b>IL-12</b>	1:250	1:250	31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000,

<b>IL-4</b>	<b>1:250</b>	<b>1:1000</b>	2000
			7.8, 15.6, 31.2,
			62.5, 125, 250,
			500

La enzima HRP se diluye 1:250 en la solución detectora con el anticuerpo de detección en todas las determinaciones.

### **7.7. Observación de la expresión de CCR7 y CD206 como marcadores diferenciales en MΦ diferenciados M1/M2.**

Apoyando la cuantificación de IL-12 e IL-4 como marcadores de diferenciación, se realizaron inmunofluorescencias en las células fijadas en las placas de 8 pozos para observar la expresión de CCR7 como marcador de polarización hacia el fenotipo de MΦ M1, y el CD206 como indicativo de MΦ M2.

Células fijadas con PFA 4 % al finalizar el cultivo de diferenciación, se lavaron con buffer de bloqueo (ASB 3 %) aplicando 50 µL por pozo dos veces. Se adicionaron posteriormente 50 µL de suero humano en cada pozo por una hora para bloquear los receptores de las fracciones critalizables (Fc) de las células, el cual fue previamente obtenido por punción venosa y centrifugado a 3,500 rpm por cinco minutos para su obtención; se hicieron dos lavados posteriores a la incubación de bloqueo. Los anticuerpos anti-CCR7 (FITC) y anti-CD206 (FITC) son diluyeron 1:100 en el buffer de bloqueo y se adicionaron en un volumen de 100 µL por pozo e incubados en oscuridad por una hora, después se realizaron dos lavados. Se adicionaron 10 µL de DAPI (dilución 1:100) y se re incubaron en oscuridad por 15 minutos para finalizar con dos

lavados más. Una vez finalizado el protocolo de inmunofluorescencia se retiraron las divisiones de la placa de 8 pozos dejando solo la laminilla, sobre la cual se agregó glicerol 70 % y se colocó un cubreobjetos para su observación en el microscopio.

### **7.8. Ensayo de estimulación en CMSP con CFP de *M. tuberculosis*.**

Antes de iniciar los ensayos de polarización de MΦ por acción de los antígenos de *M. tuberculosis* se realizaron ensayos de proliferación celular en CMSP con la finalidad de observar una respuesta positiva ante el estímulo, y se cuantificaron citocinas características de un perfil de respuesta Th1 como una respuesta inmunológica característica de este microorganismo.

#### **7.8.1. Estudio de proliferación celular ante el estímulo con CFP de *M. tuberculosis*.**

Partiendo de una muestra de sangre periférica se realizó la separación de la misma utilizando un gradiente de densidad de histopaque de manera que se obtuvo la fracción de células mononucleares implementando las mismas condiciones de separación explicadas en el protocolo de purificación de monocitos. Las CMSP fueron contadas en cámara de Neubauer para conocer su viabilidad, considerándola aceptable para continuar con el cultivo cuando es superior al 90 %. Las CMSP fueron ajustadas a una concentración de  $2 \times 10^6$  CMSP /mL y se sembraron en placas de 96 pozos aplicando 50 µL en cada

uno, utilizando tres pozos por cada tratamiento (estímulo con CFP, control basal, blanco de reactivo). Las células se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, por dos horas para permitir la adherencia de las mismas a la palca de cultivo. Los antígenos empleados para la estimulación en esta serie de experimentos es un conjunto de proteínas provenientes del cultivo de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, los cuales fueron filtrados (CFP), dializados y mantenidos en suspensión a -20 °C; de esta suspensión se preparó una solución de CFP a una concentración de 10 µg/mL, de manera que cuando se aplicaron 50 µL a cada uno de los pozos con células, dado la relación 1:1 existente, la concentración de proteína fue diluida a una concentración final de 5 µg/mL. El cultivo se reintrodujo a incubación en las mismas condiciones por 5 días, para que después de esto realizara el ensayo de proliferación celular con base en la aplicación del reactivo MTS, en el cual 20 µL fueron aplicados en cada uno de los pozos, se incubó por 30 minutos y después fueron leídos en el lector de microplacas a 490 nm a los 30, 60 y 90 minutos después de la aplicación del MTS. En cada una de las lecturas se hizo la corrección con el blanco de reactivo y la media de las lecturas de los estímulos con CFP fueron comparados con los controles basales sin estímulos.

#### **7.8.2. Producción de citocinas ante el estímulo con CFP de *M. tuberculosis*.**

El perfil de citocinas establecido para determinar una polarización hacia una respuesta Th1 en el cultivo de CMSP con CFP de *M. tuberculosis* se estableció

con la cuantificación de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4, esta última como control de respuesta Th2. Empleando el mismo protocolo de cultivo que se explicó previamente para la determinación de proliferación celular, con la variante del uso de placas de 24 pozos para obtener un mayor volumen de muestra, se utilizaron los sobrenadantes del cultivo después de una incubación de cinco días. Los sobrenadantes fueron recuperados, centrifugados para retirar restos celulares y almacenados a -20 °C hasta su empleo en los ensayos de ELISA.

Las determinaciones de la cantidad de citocinas producidas fueron realizadas empleando el mismo protocolo de ELISA tipo sándwich utilizado en la determinación de IL-12 e IL-4 como marcadores de diferenciación de los M $\Phi$  M1 y M2, sólo que ahora considerando la cuantificación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

**Tabla 5.**

**Diluciones de anticuerpos y concentraciones de estándares en la determinación de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4 por ELISA tipo sándwich.**

<b>Citocina</b>	<b>Anticuerpo de captura (dilución)</b>	<b>Anticuerpo de detección (dilución)</b>	<b>Curva estándar (concentraciones [pg/mL])</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1:250	1:250	4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1:250	1:250	7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500
<b>IL-12</b>	1:250	1:250	31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000
<b>IL-4</b>	1:250	1:1000	7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500

La enzima HRP se diluye 1:250 en la solución detectora con el anticuerpo de detección en todas las determinaciones.

### **7.9. Evaluación de la polarización de MΦ M1/M2 en condiciones de co-cultivo con linfocitos autólogos y en estímulo con CFP de *M. tuberculosis*.**

Una vez establecidos los modelos de diferenciación de MΦ y el perfil de diferenciación con los antígenos de *M. tuberculosis*, con base en la producción de citocinas, se procedió a conocer el efecto de estos mismos antígenos sobre los MΦ diferenciados, tanto con los inductores clásicos como con el empleo de las proteasas trombina y tripsina.

En placas de 24 pozos se sembraron monocitos en una concentración de  $2 \times 10^6$  monocitos/mL y se diferenciaron según los protocolos de diferenciación previamente establecidos, de manera que cuando transcurrieron las 72 horas para el modelo de los estímulos clásicos y 48 para el tratamiento con las proteasas, una primera serie de sobrenadantes correspondientes a la diferenciación solamente, fueran colectados y almacenados a -20 °C hasta el ensayo de ELISA, y los medios son sustituidos con una solución de linfocitos/CFP en RPMI suplementado. En esta solución los linfocitos provienen de la F1 de una purificación para monocitos, donde después de la elución fueron concentrados y se evaluó su viabilidad para poder ajustar una concentración de  $2 \times 10^6$  linfocitos/mL; en esta solución de linfocitos se adicionó CFP en una concentración de 5 µg/mL. La solución de linfocitos/CFP se administró en 500 µL por pozo de manera que se estableció una relación de monocitos:linfocitos 1:2, simulando la relación fisiológica normal de ambas células mononucleares. Los cultivos fueron reincubados por cinco días a 37 °C,

5 % CO<sub>2</sub>, para permitir el proceso de presentación antigénica entre los MΦ y los linfocitos y permitir la producción de citocinas dependiente de la estimulación. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación los sobrenadantes fueron recuperados, centrifugados para retirar los restos de células y almacenados a - 20 °C hasta su evaluación en los ensayos de ELISA.

En los ensayos de ELISA se realizaron las mismas determinaciones que en el ensayo de estimulación de CMSP con CFP, cuantificando la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4 siguiendo el mismo protocolo establecido en experimentos anteriores.

#### **7.10. Análisis estadístico.**

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas en el programa GraphPad Prism, utilizando análisis de varianza de ANOVA con prueba de Bonferroni y aplicando una  $p < 0.05$ .

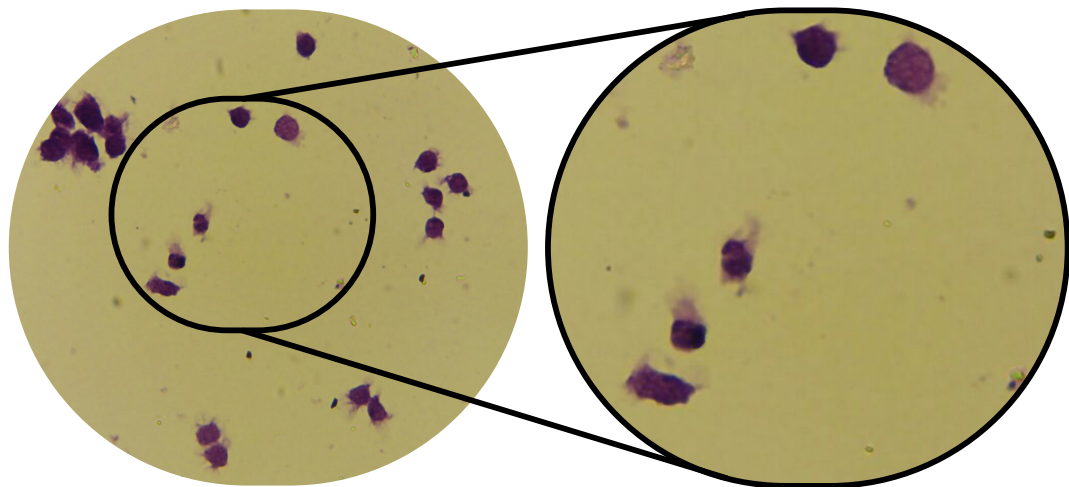


## CAPÍTULO 8

### RESULTADOS

#### 8.1. Observación morfológica de células purificadas CD14<sup>+</sup> por tinción de Giemsa.

Primeramente, como un control de las células CD14<sup>+</sup> que se obtuvieron por inmunomagnetismo se hicieron extendidos en portaobjetos y se tiñeron con el colorante de Giemsa. Cuando estos se observaron con microscopia de campo claro en un aumento de 100X, se observaron células mononucleadas, con un citoplasma grisáceo no tan abundante (Figura 10).



**Figura 10. Observación morfológica de monocitos por tinción de Giemsa.**

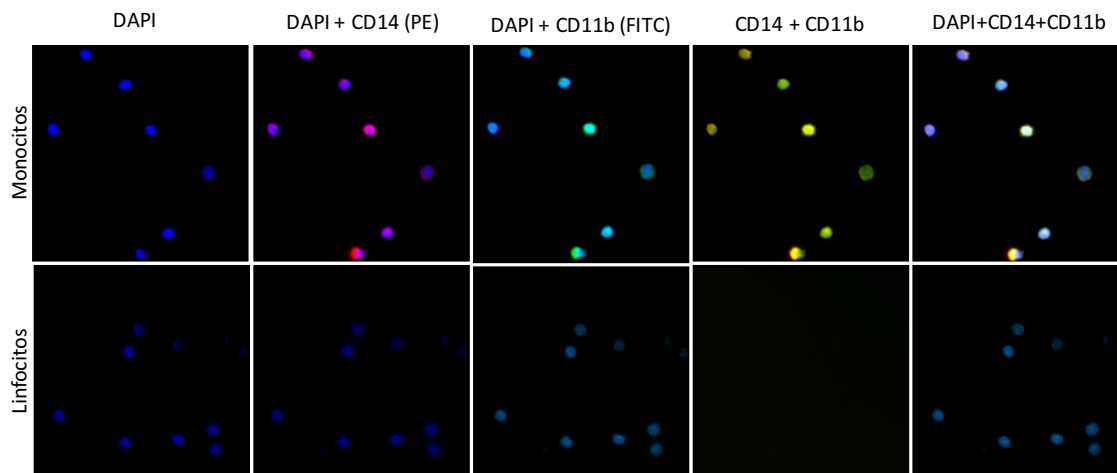
Aunque la estructura celular no fue tan definida como la observada en leucocitos mononucleares en sangre periférica, esto probablemente se debió a la serie de daños mecánicos que sufrieron en el procedimiento de purificación, sin embargo, el fenotipo de esta población celular fue confirmada por la expresión de marcadores específicos de monocitos.

## **8.2. Observación de marcadores por inmunofluorescencia de monocitos purificados.**

### **8.2.1. Expresión de CD14 y CD11b como marcadores de monocitos.**

Para comprobar el fenotipo de las células purificadas se realizó una inmunotinción para observar por fluorescencia los marcadores CD14 y CD11b en las células purificadas, los cuales son receptores específicos de monocitos. La fracción eluida correspondiente con linfocitos se utilizaron también en la inmunofluorescencia como controles negativos de la expresión de CD14 y CD11b. La tinción con DAPI permitió la ubicación del núcleo en el campo enfocado.

El anticuerpo anti-CD14 conjugado con PE y el anti-CD11b conjugado con FITC mostraron una señal positiva en monocitos y evidenciaron su especificidad cuando son fueron solapados en una misma imagen (Figura 11).

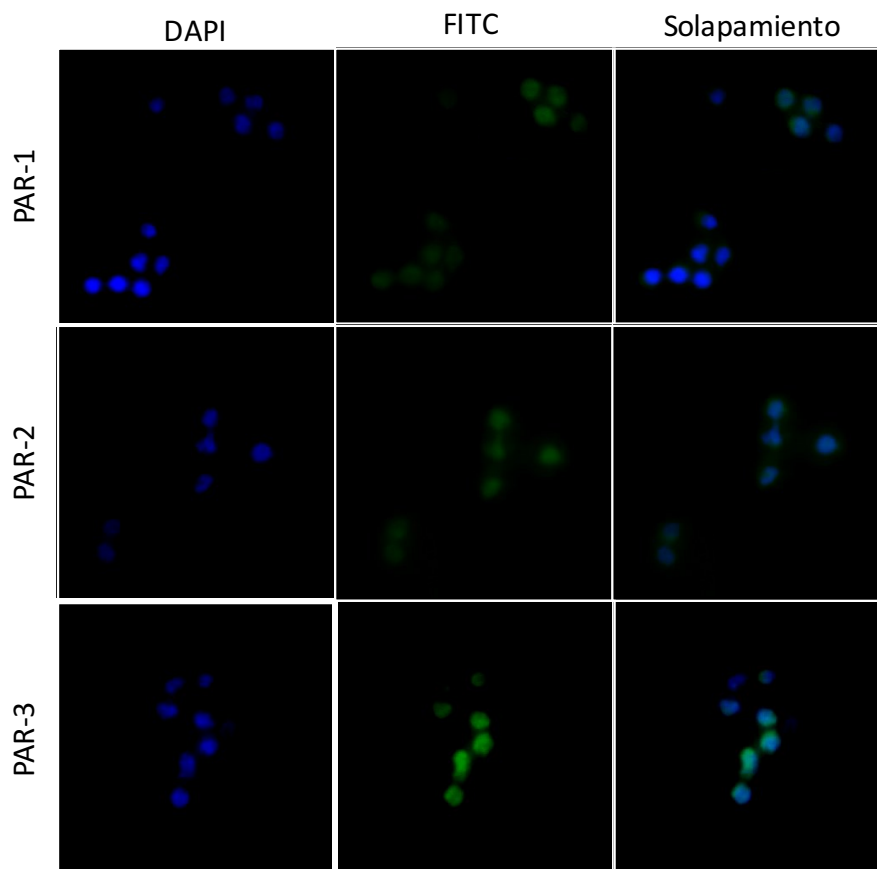


**Figura 11. Expresión de CD14 y CD11b en monocitos por inmunofluorescencia.**

Cuando la inmunofluorescencia se realizó sobre los linfocitos eluidos en la F1 de la purificación, solo se observó la señal emitida por el DAPI, lo que se tradujo en una ausente expresión de los receptores previamente mencionados, lo que apoyó la pureza de estas células.

### **8.2.2. Expresión de PARs en monocitos purificados.**

Utilizando las mismas células CD14<sup>+</sup> purificadas, se observó la expresión de PAR1, PAR2 y PAR3 mediante inmunofluorescencia, la búsqueda de PAR4 no se llevó a cabo dada su ya conocida ausencia en esta población celular<sup>202</sup>. La expresión de los tres receptores se observó en las preparaciones de estas células (Figura 12).



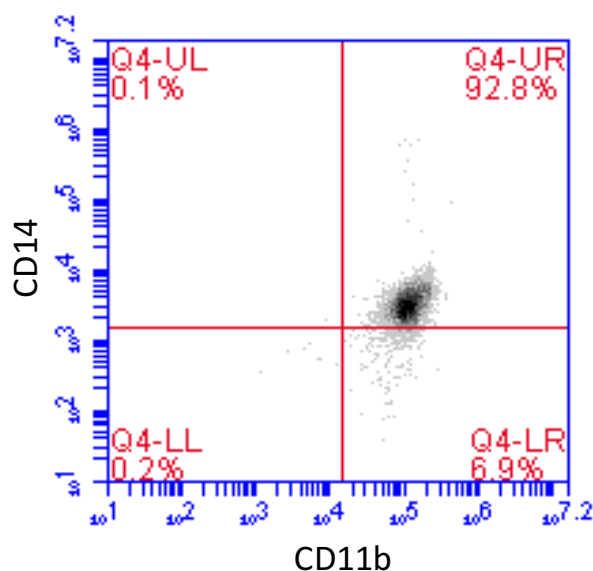
**Figura 12. Expresión de PAR1, PAR2 y PAR3 en monocitos purificados por inmunofluorescencia.**

### **8.3. Cuantificación de marcadores por citometría de flujo de células purificadas CD14<sup>+</sup>.**

#### **8.3.1. Cuantificación de CD14 y CD11b como marcadores de purificación de monocitos.**

Para comprobar el fenotipo de las células purificadas se realizó una cuantificación por citometría de flujo de los marcadores de monocitos CD14 y

CD11b, haciendo un doble marcaje en las células para poder identificar la población de células que correspondían al doble fenotipo. En el histograma mostrado en la Figura 13 se encontró que el 92.8 % de los eventos contados correspondió a las células que expresaban en su superficie tanto el receptor CD14 como el CD11b, correspondiendo a una población de monocitos.



**Figura 13. Niveles expresión de CD14 y CD11b en células purificadas.**

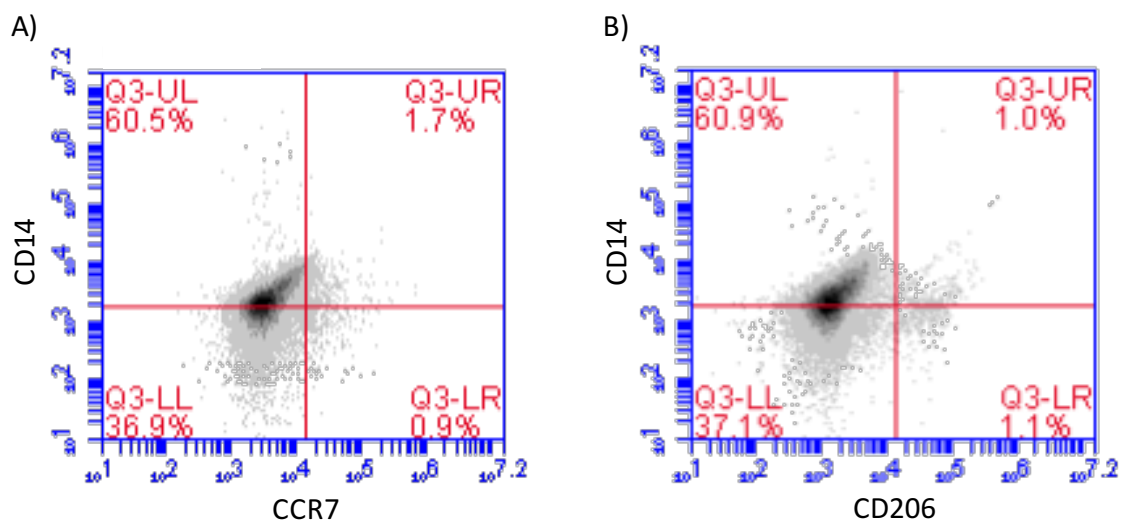
En este mismo histograma se mostró un 0.1 % y un 6.9 %, correspondientes a la expresión exclusiva del receptor CD14 y CD11b respectivamente. Finalmente, el 0.2 % de los eventos correspondió a las células que no expresaron ninguno de los receptores.

### **8.3.2. Niveles de expresión basal de CCR7 y CD206 en monocitos purificados.**

En esta población de células CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, se realizó la cuantificación de los marcadores CCR7 y CD206. Dado que ambos receptores fueron utilizados posteriormente como indicativo del efectivo proceso de diferenciación, en los monocitos purificados se cuantificó la expresión basal para confirmar que fueran receptores que no están significativamente presentes en los monocitos hasta el proceso de diferenciación en MΦ.

En la Figura 14A se observa el panel correspondiente a los monocitos marcados con el anticuerpo anti-CD14 y anti-CCR7, donde el primero sirvió como control de la población que se está evaluando y el segundo el marcador de interés. El 1.7 % de los eventos correspondió a los monocitos que expresaban el receptor CCR7, mientras que el 60.5 % eran todas las células que contaban con la expresión de CD14 en su superficie, y en contraparte el 0.9 % las células que emitieron una señal positiva para la señal de solamente CCR7. El 36.9 % de los eventos cuantificados fueron aquellas células negativas para ambos marcadores.

En cuanto al análisis de la expresión de CD206 y CD14, el 1.0 % de los eventos emitieron una señal positiva para ambos marcadores (Figura 14B), mientras que el 60.9 % los que resultaron positivos solo para el CD14 y el 1.1 % para el CD206. Finalmente, el 37.1 % de las células correspondieron a aquellas negativas para ambos receptores.

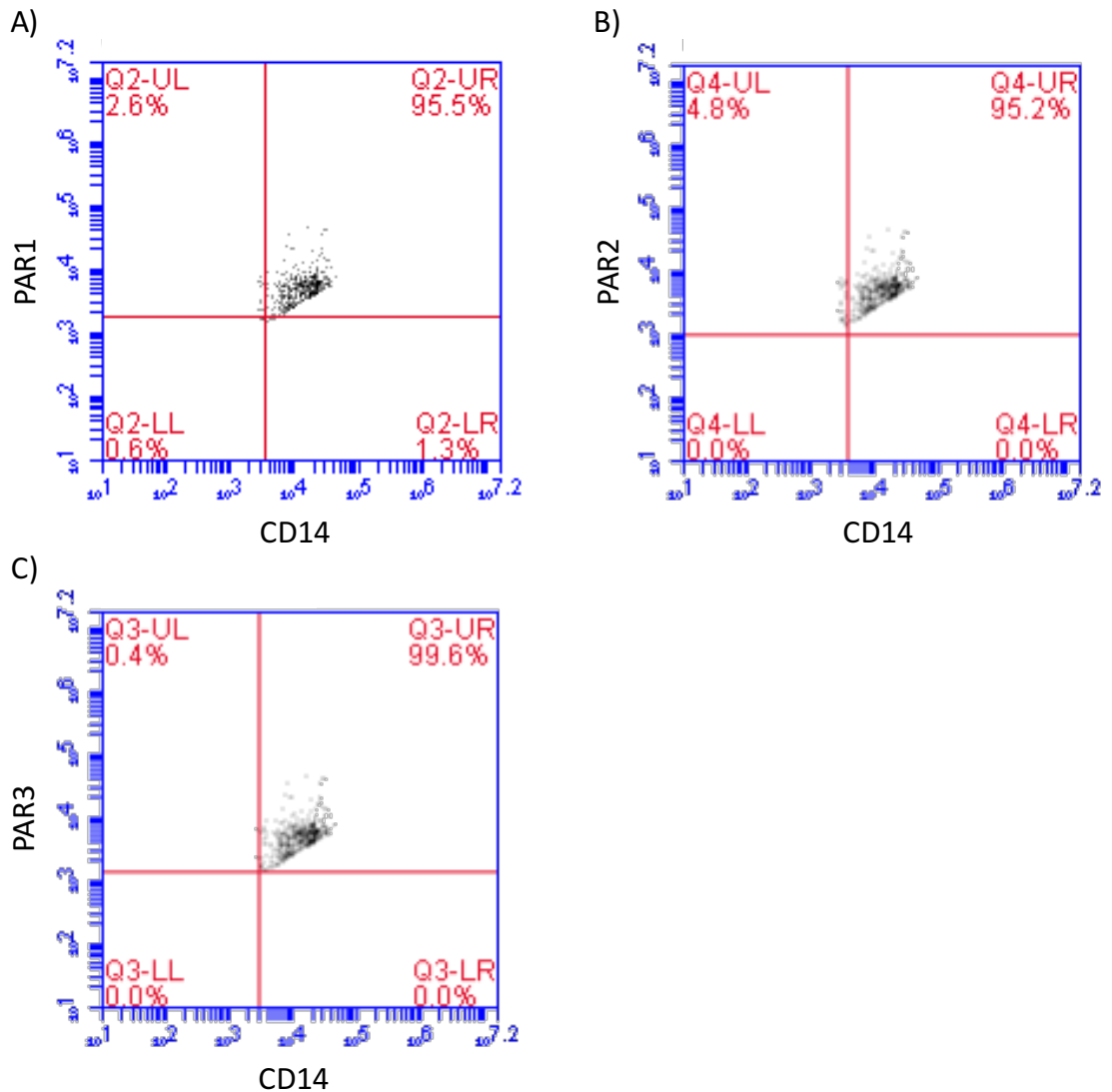


**Figura 14. Niveles expresión de CD14 y CCR7 (A), y CD14 y CD206 (B) en células purificadas.**

### 8.3.3. Niveles de expresión de PARs en monocitos purificados.

Además de conocer la expresión basal de los receptores CCR7 y CD206 se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores PAR1, PAR2 y PAR3 para conocer en qué medida estaban diferencialmente expresados, acompañados del marcaje con el receptor CD14 como el control de la población celular de estudio. Los porcentajes de eventos doble positivos en los marcajes con los tres PARs fueron del 95.5 % (Figura 15A), 95.2 % (Figura 15B) y 99.6 % (Figura 15C) para PAR1, PAR2 y PAR3 respectivamente. Sin embargo, hubo histogramas que presentaron el marcaje solamente para los PARs, como 2.6 % en el PAR1, el 4.8 % en el PAR2 y el 0.4 % en PAR 3, siendo negativos para el CD14. Por otro lado, solo en el histograma de PAR1 se mostró un porcentaje de

positividad del 1.3 % para el receptor CD14, siendo nulo en los otros dos receptores.



**Figura 15. Niveles expresión de CD14 y PAR1 (A), CD14 y PAR2 (B), y CD14 y PAR3 (C) en células purificadas.**

Finalmente, 0.6 % de los eventos cuantificados en el histograma de PAR1 fueron doblemente negativos para ambos marcadores, con un 0 % de



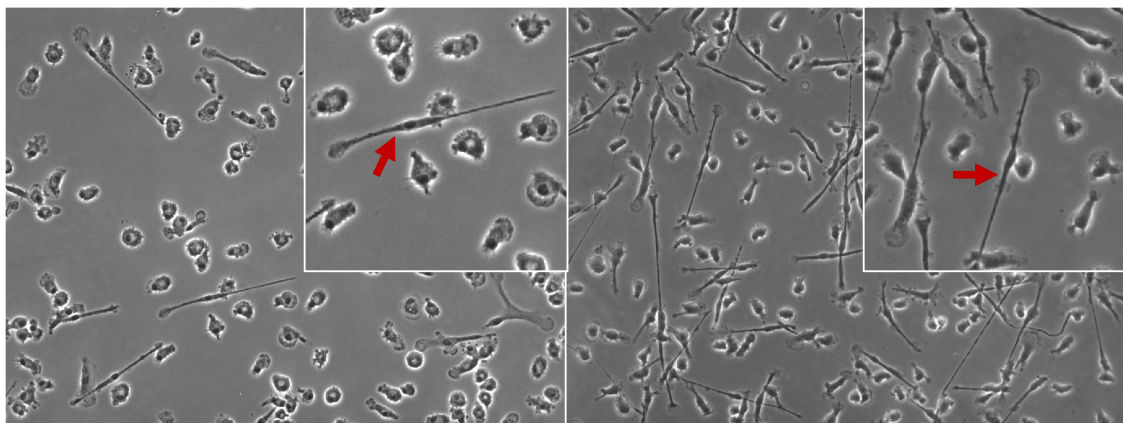
dobles negativos para los otros dos PARs. La información conferida por este experimento fue la base para poder realizar los ensayos de diferenciación con proteasas.

#### **8.4. Efecto del IFN- $\gamma$ /LPS y la IL-4 en la polarización de M $\Phi$ M1 y M2.**

##### **8.4.1. Cambios morfológicos en los monocitos dependientes de estímulo.**

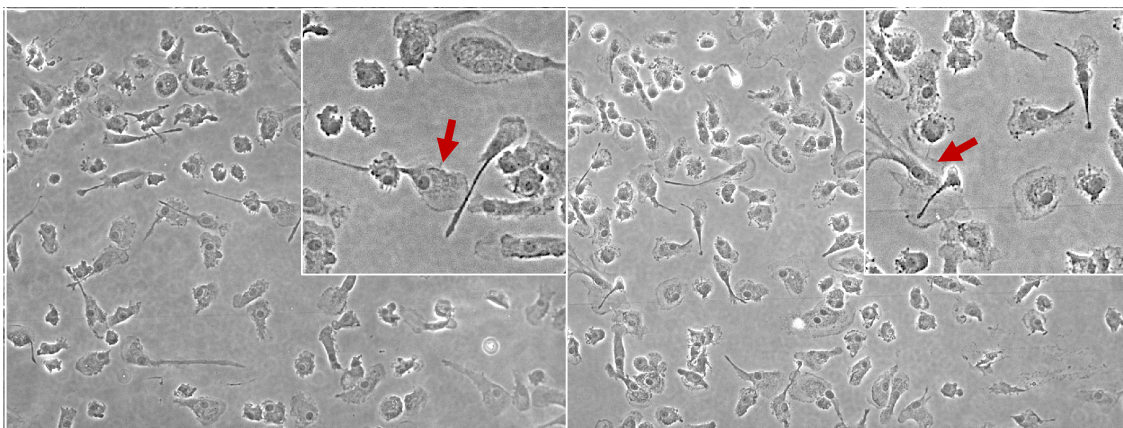
Una de las primeras evaluaciones en la diferenciación de los monocitos a M $\Phi$  fue la observación de los cambios morfológicos que estas células presentaron.

Cuando los monocitos fueron tratados con IFN- $\gamma$  y LPS después de la pre-diferenciación con GM-CSF las células observadas en campo claro mostraron una serie de prolongaciones en el citoplasma manteniendo su núcleo en el centro celular, lo que les confirió una estructura del tipo fibroblasto como se muestra en las flechas rojas (Figura 16). Además, se presentaron otras células con una estructura más pequeña con morfología redondeada, las cuales probablemente representan células que no alcanzaron el proceso de diferenciación, sin embargo, para conocer su fenotipo y confirmar su polarización se observaron los marcadores de diferenciación.



**Figura 16. Cambios morfológicos en células estimuladas con INF- $\gamma$ /LPS.**

Por otro lado, cuando se utilizó la IL-4 como el estímulo de diferenciación la morfología fue totalmente distinta a la observada en la imagen anterior. Las células en este caso presentaron una morfología más heterogénea con prolongaciones citoplasmáticas más desorganizadas incluyendo subprolongaciones, lo que en las mayormente diferenciadas les confirió una morfología tipo neuronal (Figura 17). Los núcleos permanecieron centrales donde el citoplasma estaba mayormente concentrado y de donde nacían sus prolongaciones (Flechas rojas).

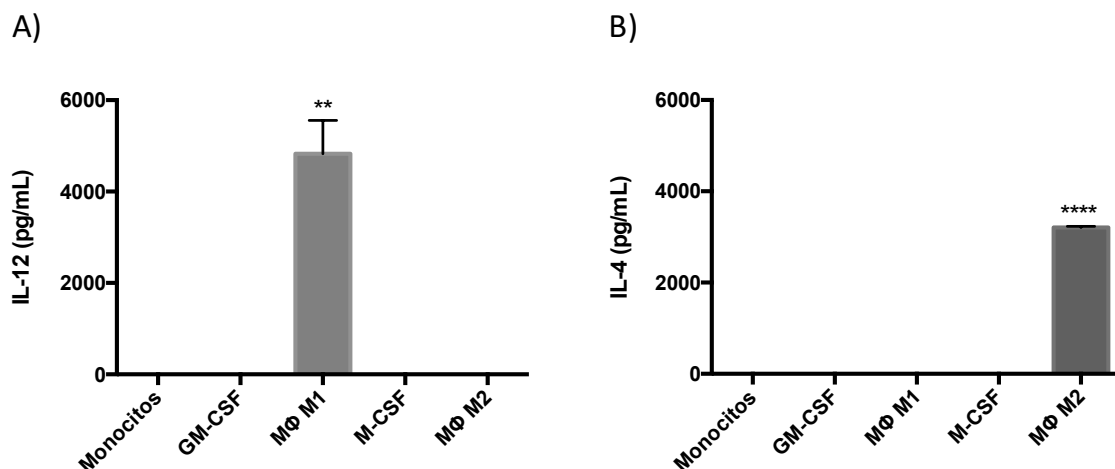


**Figura 17. Cambios morfológicos en células estimuladas con IL-4.**

En este último cultivo también se observaron células con una morfología similar a la de un monocito presentando una forma redondeada y un tamaño pequeño en comparación con las células aparentemente diferenciadas, sin embargo, hasta la observación de los debidos marcadores no fue posible asegurarlo.

#### 8.4.2. Cuantificación de IL-12 e IL-4 en la diferenciación.

La cuantificación de IL-12 e IL-4 fue empleada como marcadores de diferenciación, debido a que son citocinas normalmente producidas por los MΦ M1 y MΦ M2 respectivamente (Figura 18).



**Figura 18. Producción de IL-12 (A) e IL-4 (B) en MΦ diferenciados.** MΦ M1 diferenciados con IFN- $\gamma$ /LPS y MΦ M2 diferenciados con IL-4 en un periodo de incubación de tres días ( $p < 0.05$ ).

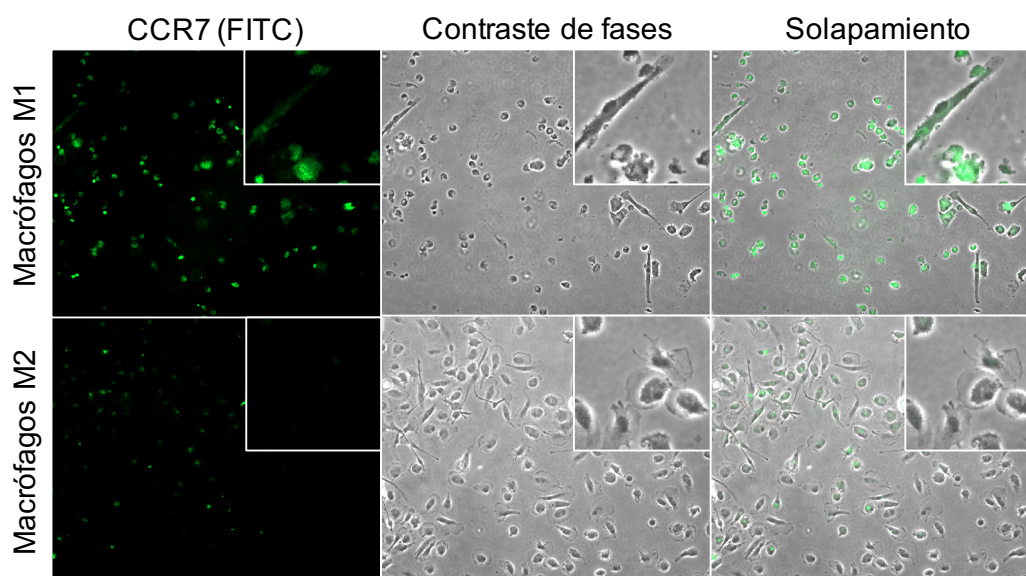
Cuando se realizó la cuantificación en los sobrenadantes de los cultivos en el proceso de pre-diferenciación, aquellos correspondientes a los monocitos estimulados con GM-CSF y M-CSF, no se observó la producción de ninguna de las dos citocinas como tampoco se observó en los controles basales en los que los monocitos no recibieron ningún estímulo.

Sin embargo, cuando esta cuantificación se realizó en las células estimuladas con INF- $\gamma$ /LPS (M $\Phi$  M1) se observó la producción de IL-12 pero no de IL-4 (Figura 18A) y viceversa, cuando el estímulo tuvo como finalidad la diferenciación hacia M $\Phi$  M2 la IL-4 fue la producida y no la IL-12 (Figura 18B).

#### **8.4.3. Expresión diferencial de CCR7 y CD206 en M $\Phi$ diferenciados.**

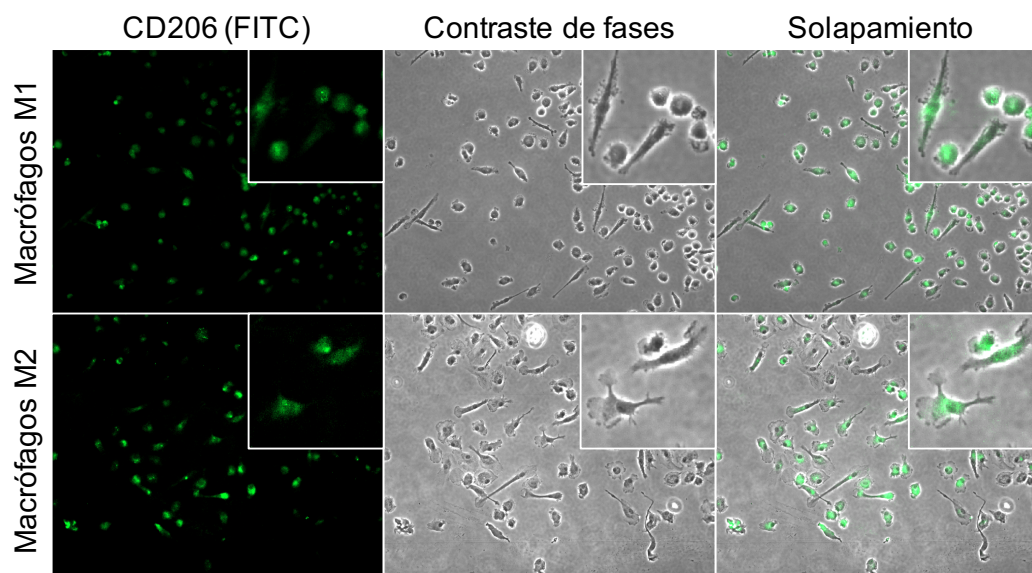
Para apoyar la información arrojada por la cuantificación de citocinas en los ensayos de ELISA se realizaron tinciones para observar por inmunofluorescencia la expresión de receptores específicos tanto para M $\Phi$  M1 como M $\Phi$  M2, siendo estos el CCR7 y el CD206 respectivamente.

Cuando se realizó la observación del CCR7 este solo expone una señal positiva en aquellas células que fueron tratadas con IFN- $\gamma$  y LPS (Figura 19), por otra parte, este receptor no se observó en las células estimuladas con IL-4.



**Figura 19. Expresión de CCR7 en MΦ M1.**

Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con IL-4 estas expresaron CD206 (Figura 20). Sorprendentemente las células cuyo proceso de diferenciación tiene por objetivo los MΦ M1 también presentaron una positividad para este marcador.



**Figura 20. Expresión de CD206 en MΦ M2.**

En conjunto, la información aportada por las citocinas cuantificadas y la observación de señales positivas en los marcadores, en diferentes situaciones dependientes del estímulo, sugirió que aquellas células tratadas con IFN- $\gamma$  y LPS bacteriano, productoras de IL-12 y que expresaron tanto al CCR7 como el CD206 correspondieron a M $\Phi$  del fenotipo M1, mientras que en las que se administró IL-4 como estímulo, y esta misma se cuantificó además de la observación del CD206, fue indicativo del fenotipo de M $\Phi$  M2. Ambos resultados fueron evidencia del correcto protocolo de diferenciación planteado.

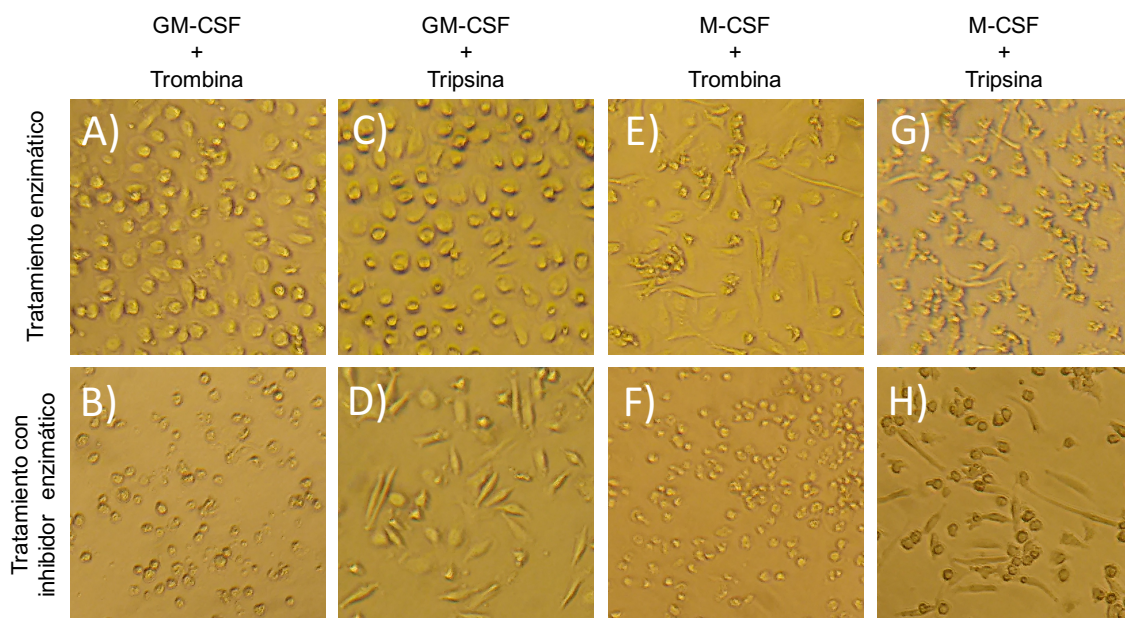
### **8.5. Efecto de trombina y tripsina en la polarización de M $\Phi$ .**

#### **8.5.1 Cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con proteasas.**

Una vez que se estableció el modelo de diferenciación con los estímulos convencionales, se probaron el efecto de la trombina y la tripsina en conjunto tanto con el factor de crecimiento GM-CSF como el M-CSF, y como un control de estos cuatro planteamientos se aplicaron ensayos paralelos en los que se utilizaron inhibidores de los PARs, los cuales ayudan a verificar el efecto específico de dichos receptores.

En aquellos tratamientos en los que se utilizó el GM-CSF como factor de crecimiento, cuando se aplicó tanto la trombina como la tripsina se observó un cambio morfológico no tan distinto de los monocitos típicos, mostrando una morfología redondeada (Figura 21A, C).





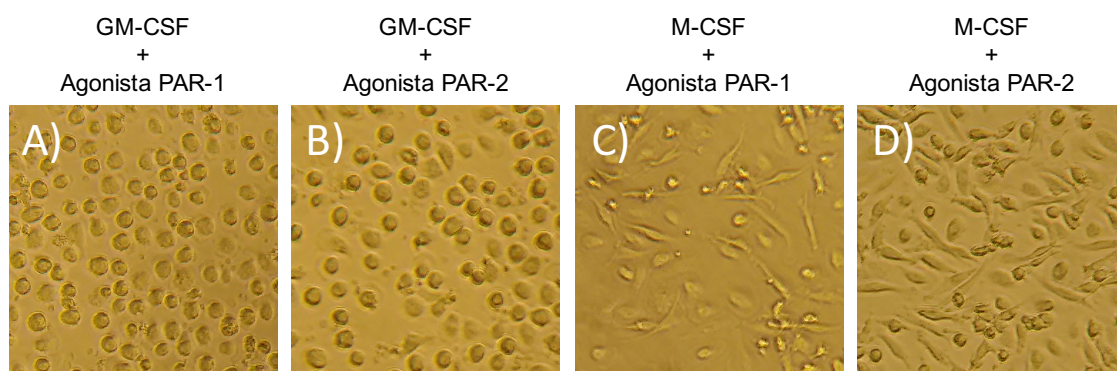
**Figura 21. Efecto en la morfología celular de MΦ en la diferenciación con trombina y tripsina y con GM-CSF y M-CSF.**

Por otro lado, cuando se utilizaron los inhibidores de los receptores, en aquellas células tratadas con trombina no hubo ningún efecto evidente ya que las células se mantuvieron redondas y pequeñas en comparación con las tratadas con la enzima (Figura 21B). Por su parte, cuando el inhibidor se aplicó junto con la tripsina las células adquirieron una morfología distinta a la observada en la tripsina, presentando una estructura alargada similar a como se observó en el protocolo de estímulos convencionales (Figura 21D).

Por otro lado, cuando en el experimento se utilizó el M-CSF como factor de crecimiento, tanto los tratamientos con trombina (Figura 21E) como con tripsina (Figura 21G) adquirieron una estructura celular alargada con más prolongaciones citoplasmáticas, siendo más heterogéneas después del tratamiento con tripsina. Cuando se utilizó el inhibidor de PAR1 en el

tratamiento de la trombina, se mostró un efecto similar al observado después del tratamiento con el factor de crecimiento GM-CSF, en el que las células parecen no haber progresado en la diferenciación (Figura 21F). Además, en las células con inhibidor para PAR2, estas presentaron una morfología más definida con prolongaciones citoplasmática más evidentes (Figura 21H).

Posteriormente se evaluó el efecto de la diferenciación empleando los agonistas de los receptores PAR1 y PAR2, donde se observó un resultado similar al obtenido con la administración de las proteasas. Cuando el agonista de PAR1 o de PAR2 fueron dispuestos en conjunto con GM-CSF las células mantuvieron una estructura redondeada (Figura 22A-B), como la obtenida con la trombina y la tripsina, mientras que cuando el M-CSF fue el factor de crecimiento empleado, ambos agonistas sostuvieron una similitud en los resultados obtenidos presentándose como células alargadas en ambos casos (Figura 22C-D) más parecidas a las obtenidas con M-CSF + trombina.



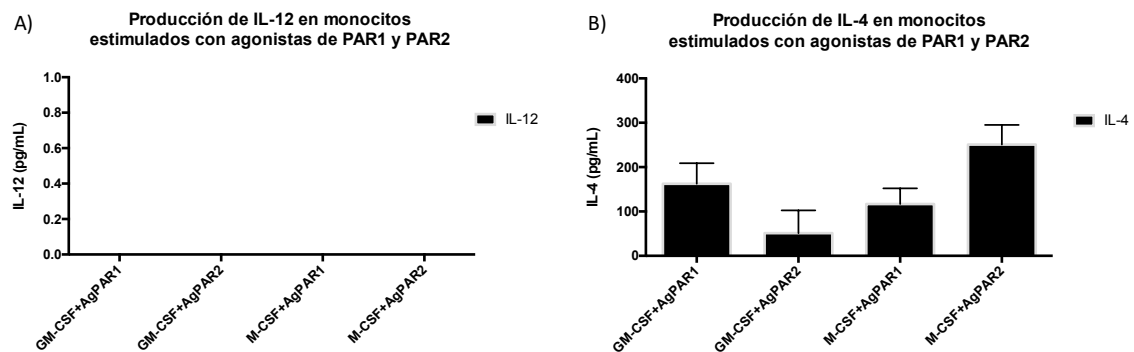
**Figura 22. Cambios morfológicos dependientes de los agonistas de los PARs en la diferenciación de MΦ.**



Con base en lo obtenido en estos cuatro tratamientos se pudo observar que las diferencias que existen entre los efectos conferidos por la activación de cada uno de los receptores, además de la aportación que ofrecen los factores de crecimiento. Para los análisis posteriores no se descartó ninguna variable, por lo que el análisis tanto de citocinas como de marcadores se realizó en los cuatro planteamientos.

### 8.5.2. Producción de IL-4 en MΦ diferenciados con proteasas.

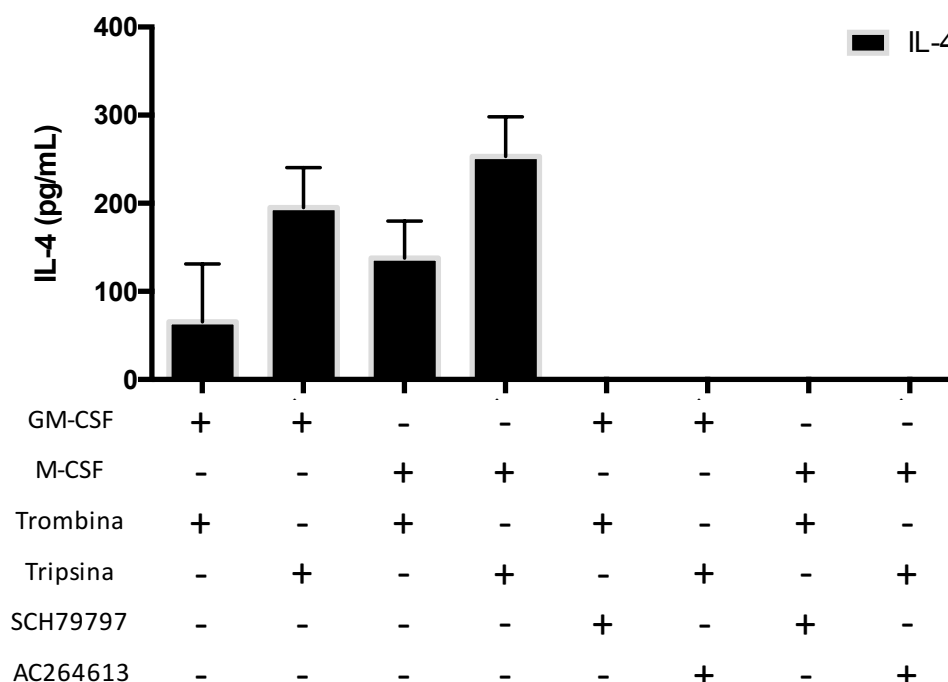
En este caso la cuantificación de citocinas primeramente se realizó en los tratamientos cuyo estímulo fueron los agonistas de PAR1 y PAR2 para conocer el efecto específico de la activación de estos receptores. En esta serie de experimentos en los que se cuantificó la IL-12 y la IL-4 como marcadores de diferenciación al fenotipo de MΦ M1 y MΦ M2 respectivamente, se observó que la IL-12 estaba ausente en todas las condiciones de cultivo (Figura 23A), mientras que la IL-4 se presentó con resultados variables positivos (Figura 23B).



**Figura 23. Cuantificación de IL-12 e IL-4 dependiente de la activación de los PARs. ( $p < 0.05$ ).**

Con base en el resultado anterior, dado que la producción de citocinas dependiente de la activación de los PARs solo involucró la producción de IL-4, en los tratamientos con las proteasas trombina y tripsina sólo se realizó esta determinación, empleando como control los inhibidores de los receptores para confirmar que el efecto, otra vez, era dependiente de la activación de los mismos. Aunque en los cuatro tratamientos la producción de IL-4 se presentó, esta se produjo en distintos niveles siendo más abundante por ejemplo en las condiciones donde se administró tripsina (195.14 pg/mL y 253.26 pg/mL) con respecto a la aplicación de trombina (37.87 pg/mL y 137.95 pg/mL), de manera similar cuando se empleó el M-CSF, este incrementó los niveles observados (137.95 pg/mL y 253.26 pg/mL) con respecto al GM-CSF (37.87 pg/mL y 195.14 pg/mL), como se muestra en la Figura 24.

Posteriormente, para asegurar que el efecto de las proteasas fue dependiente de la activación de los receptores se empleó el inhibidor SCH79797 para bloquear al PAR1 y al AC264613 para el PAR2. En todos los casos los niveles de producción de la IL-4 se mantuvo ausente inclusive con respecto a los diferentes factores de crecimiento utilizados (Figura 24), de manera que efectos asociados a la diferenciación por la trombina y la tripsina fueron específicos de la activación, particularmente del PAR1 y el PAR2; esta información fue apoyada por los resultados obtenidos previamente donde se observó que son los agonistas de estos mismos receptores los que llevan a cabo el efecto.

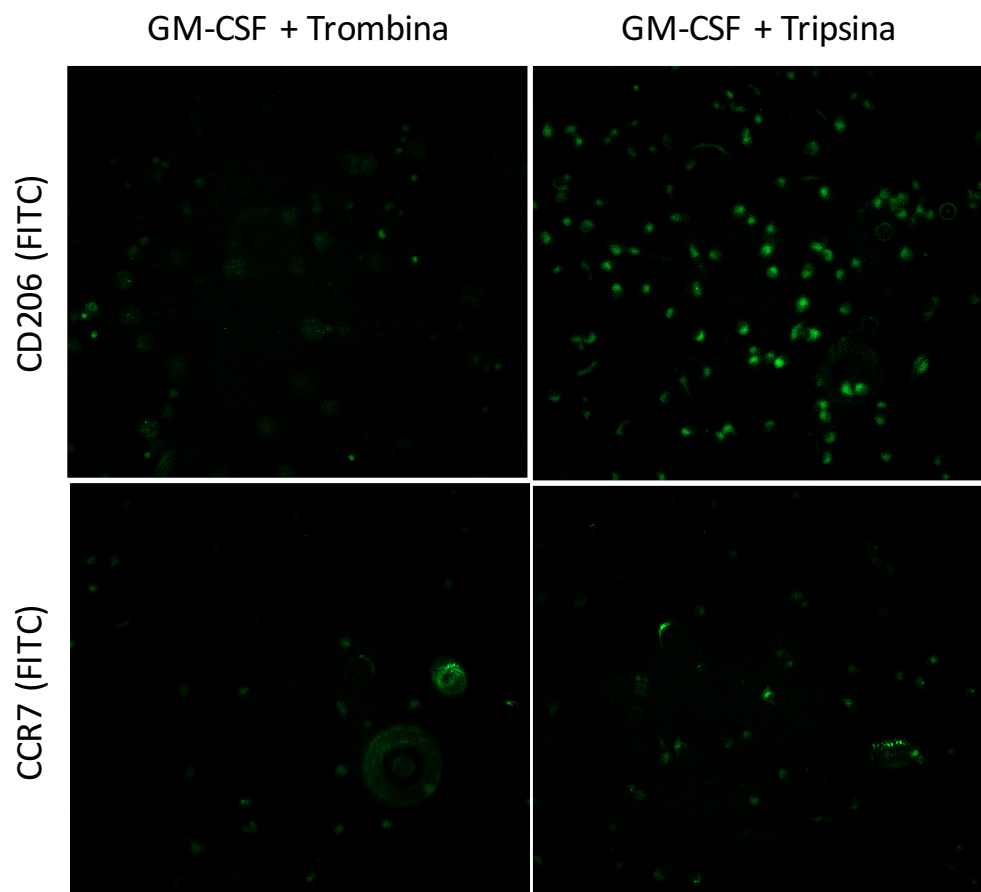


**Figura 24. Producción de IL-4 en monocitos estimulados con trombina y tripsina.**

Empleo de antagonistas farmacológicos de los receptores PARs: SCH79797 inhibidor de PAR1; AC264613 inhibidor de PAR2 ( $p < 0.05$ ).

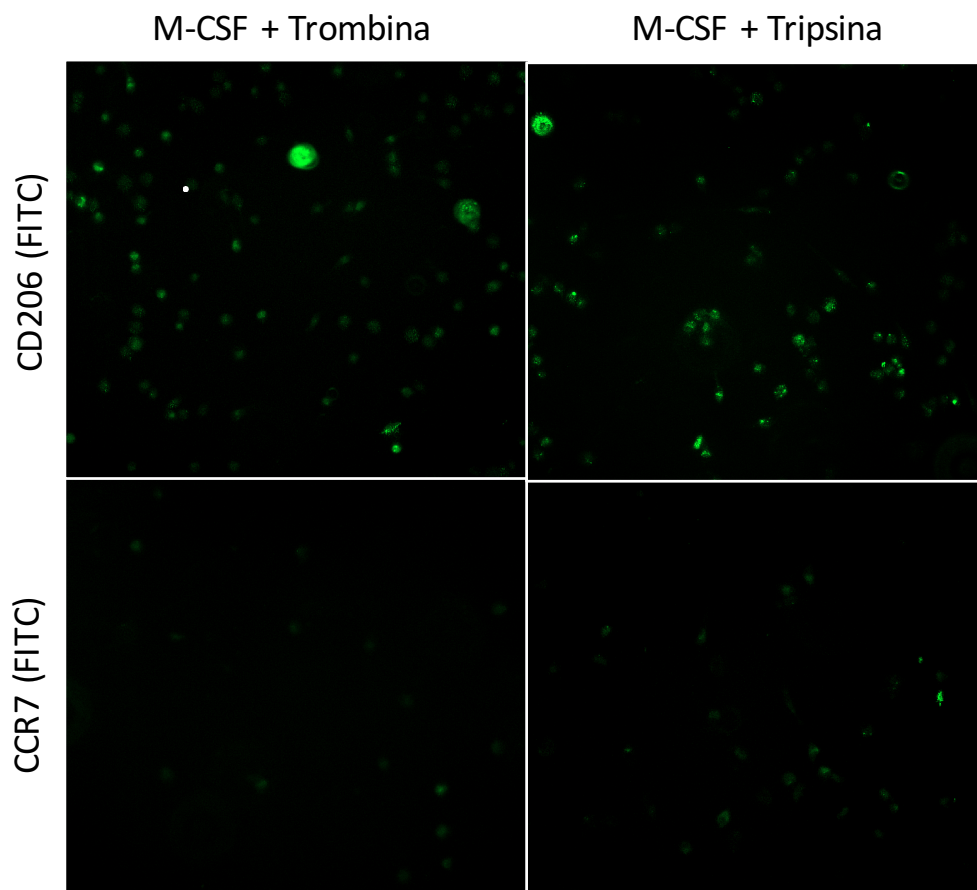
### 8.5.3. Las proteasas inducen la expresión del receptor de manosa (CD206).

Cuando en estas células diferenciadas se realizó la inmunofluorescencia para determinar los marcadores de expresión en MΦ, se observó una señal positiva para el receptor de manosa en aquellas que se pre-estimularon con GM-CSF y posteriormente con trombina y tripsina (Figura 25A y 25C), con respecto a la nula expresión de CCR7 en estos mismos tratamientos de diferenciación (Figura 25B y 25D).



**Figura 25. Expresión de CD206 en monocitos estimulados con trombina y tripsina y estimulación previa con GM-CSF.**

Cuando en esta misma serie de experimentos el protocolo se modificó para emplear el M-CSF como factor de crecimiento en la pre-diferenciación y se realizó la estimulación con trombina y tripsina, se observaron resultados muy similares en cuanto a la expresión en la superficie del CD206 (Figura 26A y 26C). Así mismo el resultado negativo que involucra la expresión del CCR7 (Figura 26B y 26D) sostiene el fenotipo observado en el experimento anterior.



**Figura 26.** Expresión de CD206 en monocitos estimulados con trombina y tripsina y estimulación previa con M-CSF.

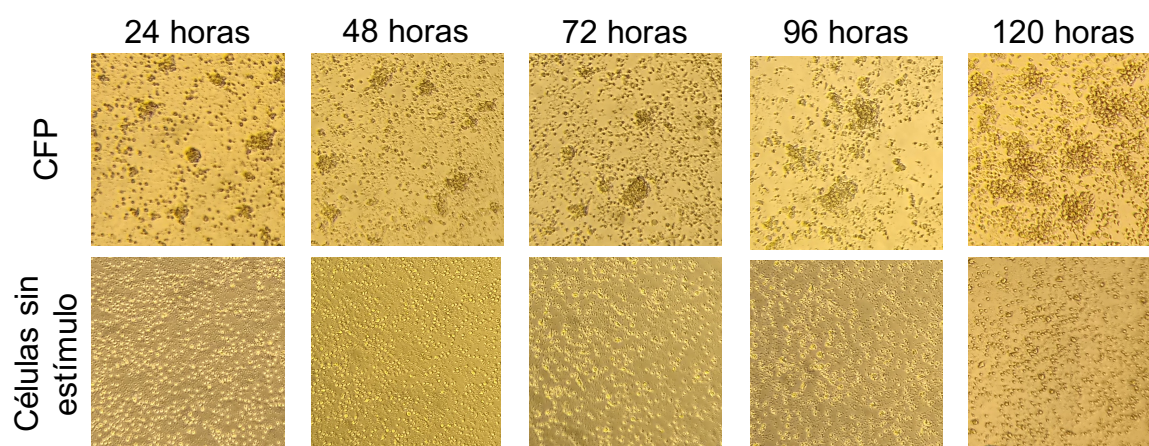
## **8.6. Las CMSP responden ante el estímulo de CFP de *M. tuberculosis*.**

### **8.6.1. Evaluación de la capacidad proliferativa.**

Una vez establecidos los modelos de diferenciación para la obtención de MΦ provenientes de monocitos de sangre periférica, se evaluó el efecto que tienen los antígenos de *M. tuberculosis* sobre las células de los sujetos de estudio, de manera que se omitieron aquellos individuos cuya respuesta ante el estímulo es

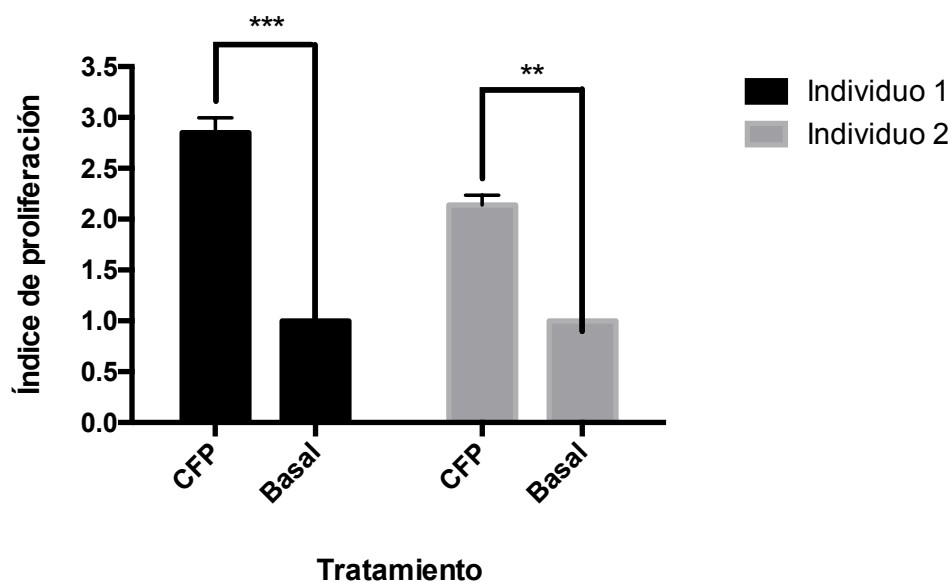
muy débil o inexistente. Estableciendo que personas son aquellas que reaccionan positivamente en el estudio de proliferación, son las que fueron considerados para la diferenciación de sus monocitos y poder realizar la estimulación.

Como primera evidencia de la positividad de la reacción se realizó la observación microscópica de las células en el transcurso de cinco días, y como indicativo del efecto se observaron cúmulos celulares, los cuáles correspondieron a aquellas células que después de la presentación antigénica iniciaron un proceso de proliferación celular. Aunque este efecto fue apreciable desde las 24 horas, se observó el crecimiento gradual en el tiempo mostrando el mayor resultado a las 120 horas (Figura 27). Cuando estas observaciones se compararon con la serie de tratamientos en los que no se aplicó CFP se pudo observar que en el mismo transcurso de tiempo no hay evidencia de los mismos cúmulos celulares.



**Figura 27. Desarrollo de la proliferación celular en CMSP estimuladas con CFP de *M. tuberculosis*.**

Cuando el efecto proliferativo de las células se cuantificó por acción del MTS, se pudo apreciar en la Figura 28 el resultado independiente de dos individuos, en el cual la tasa de proliferación se observa hasta tres veces más grande con respecto al basal sin estímulo.

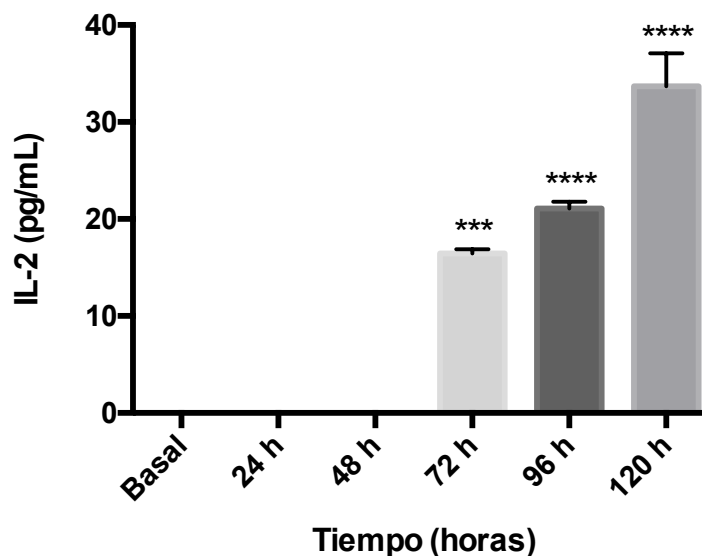


**Figura 28. Representación gráfica de la proliferación en CMSP con CFP en 5 días.** CMSP estimuladas con 5 µg/mL de CFP contra el control basal sin estímulo ( $p < 0.05$ ).

#### 8.6.2. Cuantificación de IL-2 como marcador de proliferación celular.

Una manera más sensible de medir proliferación celular fue la determinación de los niveles de la citocina mitogénica, IL-2. Esta cuantificación se realizó en los sobrenadantes de los cultivos de CMSP estimuladas con CFP de *M. tuberculosis* recolectados cada 24 horas desde su aplicación y hasta el día cinco. Los niveles de producción de IL-2 aparecieron hasta las 72 horas (16.44

pg/mL), con un pico máximo de producción a las 120 horas con 33.68 pg/mL (Figura 29).



**Figura 29. Producción de IL-2 en CMSP estimuladas con CFP de *M. tuberculosis* como marcador de proliferación celular.** CMSP estimuladas con 5 µg/mL de CFP para inducir la producción de IL-2 ( $p < 0.05$ ).

Con la evidencia proporcionada en el ensayo de proliferación celular y cuantificación de IL-2 se logró establecer el efecto de reactividad de los antígenos de *M. tuberculosis* en las CMSP de los individuos de estudio.

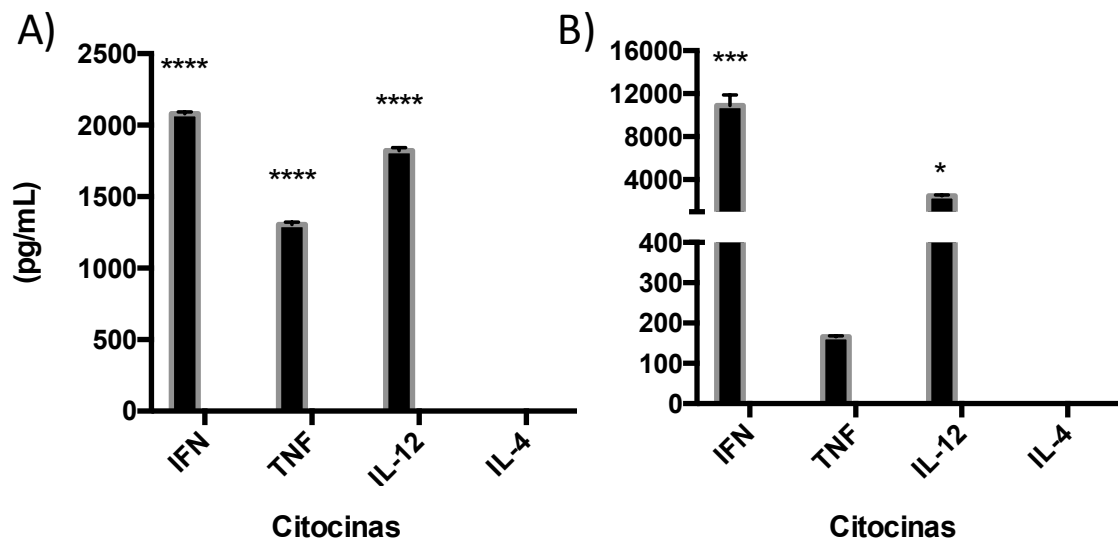
### **8.6.3. CFP de *M. tuberculosis* induce un perfil de respuesta Th1 en CMSP.**

Posterior a la determinación de proliferación celular ante el estímulo de CFP de *M. tuberculosis* se determinaron las citocinas que este debió inducir en las CMSP, las cuales dada su naturaleza antigénica promovieron la producción de



citocinas del tipo Th1. Para este ensayo se cuantificaron IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y la IL-12, así mismo, se cuantificó la IL-4 como control de polaridad de respuesta, siendo este un marcador de carácter Th2.

En la Figura 30 se representan la cuantificación de citocinas en dos experimentos independientes correspondientes a los dos individuos cuyos resultados de proliferación celular se mostraron previamente. En ambos casos se observa como el IFN- $\gamma$  es la citocina mayormente producida (2,080.91 pg/mL y 10,883.5 pg/mL), después de la cuantificación de IL-12 (1,821 pg/mL y 2,491.8 pg/mL) y el TNF- $\alpha$  (1,305.6 pg/mL y 165.7 pg/mL) (Figura 30).



**Figura 30. Producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en CMSP estimuladas con CFP de *M. tuberculosis* en dos individuos.** CMSP del individuo 1 (A) e individuo 2 (B) estimuladas con 5  $\mu$ g/mL de CFP para inducir la producción citocinas ( $p < 0.05$ ).

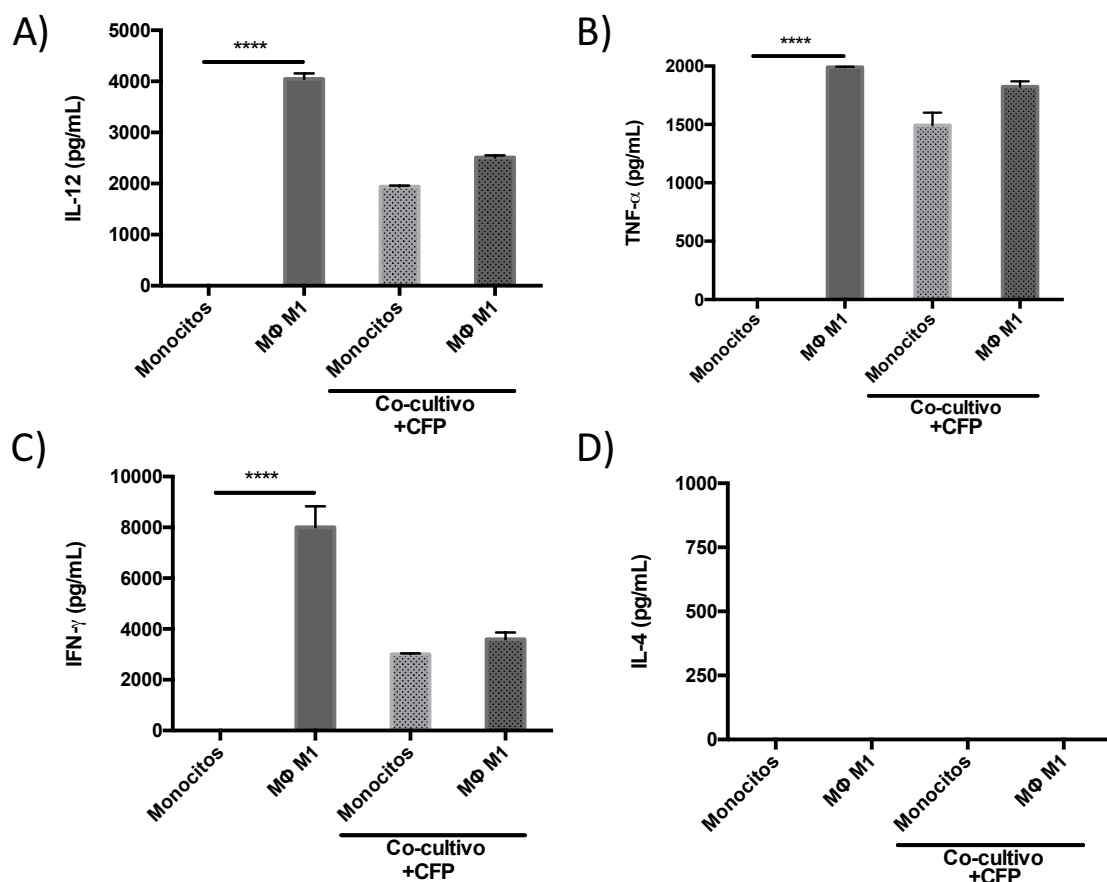
En lo que respecta a la producción de IL-4, como era de esperarse esta no se presentó, dado a que es una citocina que no corresponde con el perfil de respuesta establecido por los antígenos de la micobacteria.

### **8.7. Los MΦ diferenciados se plastifican ante el estímulo de CFP de *M. tuberculosis*.**

#### **8.7.1. Los MΦ M2 revierten su fenotipo a MΦ M1 cuando son diferenciados con IL-4.**

Posteriormente, se tomaron MΦ M1, para saber cuál era el resultado en su fenotipo cuando se exponían a los antígenos de *M. tuberculosis*, para lo cual debía haber linfocitos de por medio para que el proceso de procesamiento y presentación del antígeno se llevara a cabo.

Como un control del proceso de diferenciación se cuantificó a la IL-12 y a la IL-4 como se había aplicado previamente, sirviendo la IL-12 como el marcador del fenotipo de MΦ M1 (Figura 31A), mientras que la IL-4 no se presentó (Figura 31D). Además de la IL-12, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  también mostraron producirse ante el mismo estímulo (Figura 31C y 31B), resultando significativo con respecto a los controles sin estímulo, lo que sustenta el fenotipo de los MΦ pro-inflamatorios.

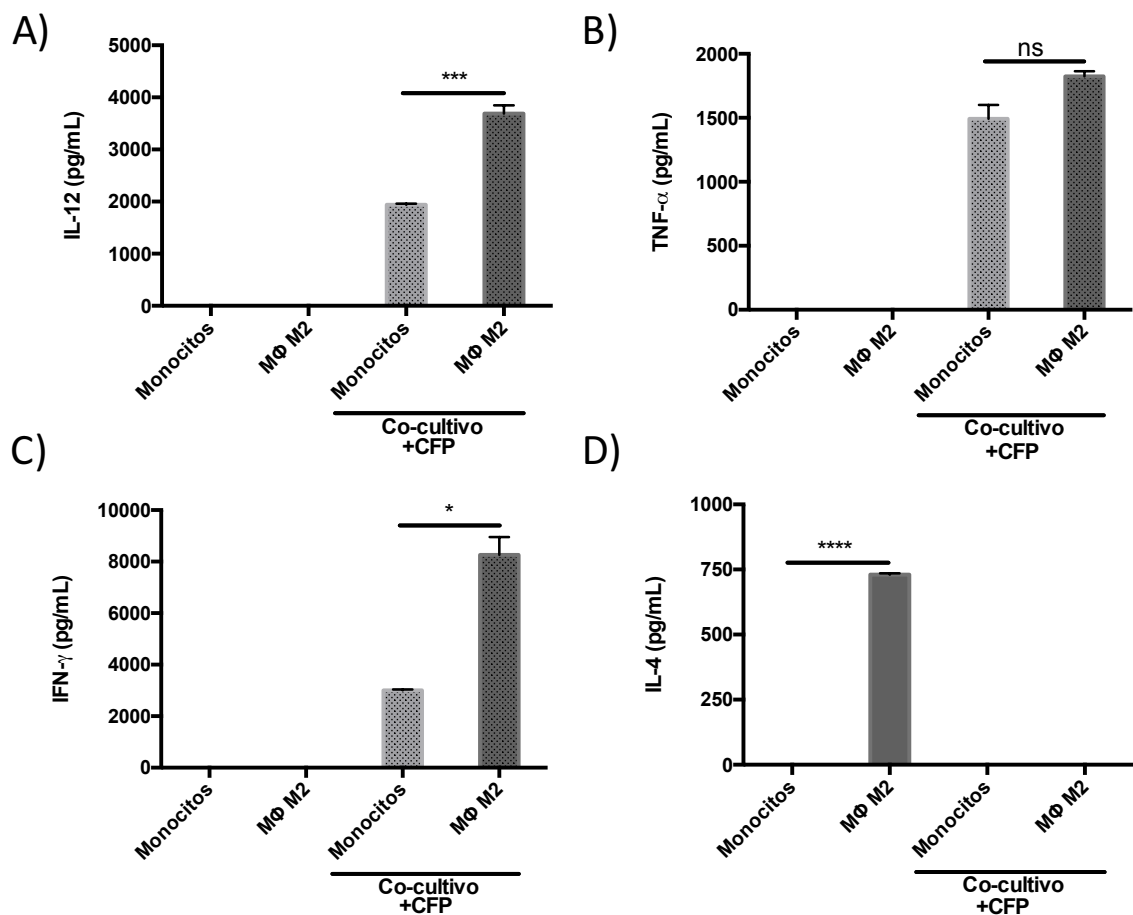


**Figura 31. Producción de citocinas en MΦ M1 estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

Por otro lado, cuando estos MΦ fueron estimulados con CFP estos no presentaron cambios, manteniendo el mismo perfil de citocinas observado previamente. Sin embargo, hay que destacar que después del tratamiento con CFP los controles adquirieron el mismo carácter Th1, debido a que el antígeno actúa en un sistema homólogo a cuando se emplearon las CMSP.

Cuando son las células M2 las que fueron tratadas con los antígenos de *M. tuberculosis* el panorama es inverso. En este sentido, cuando se realizó la diferenciación de los monocitos con IL-4 ninguna citocina es producida,

solamente la IL-4, asumiendo un fenotipo del tipo MΦ M2, sin embargo, posterior a la estimulación con los antígenos ese fenotipo productor de IL-4 desapareció (Figura 32D), y en su lugar se presentó la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 32A), IL-12 (Figura 32B) y TNF- $\alpha$  (Figura 32C), lo que resultó indicativo de cómo ese fenotipo de MΦ M2 revirtió al ahora fenotipo de MΦ M1.

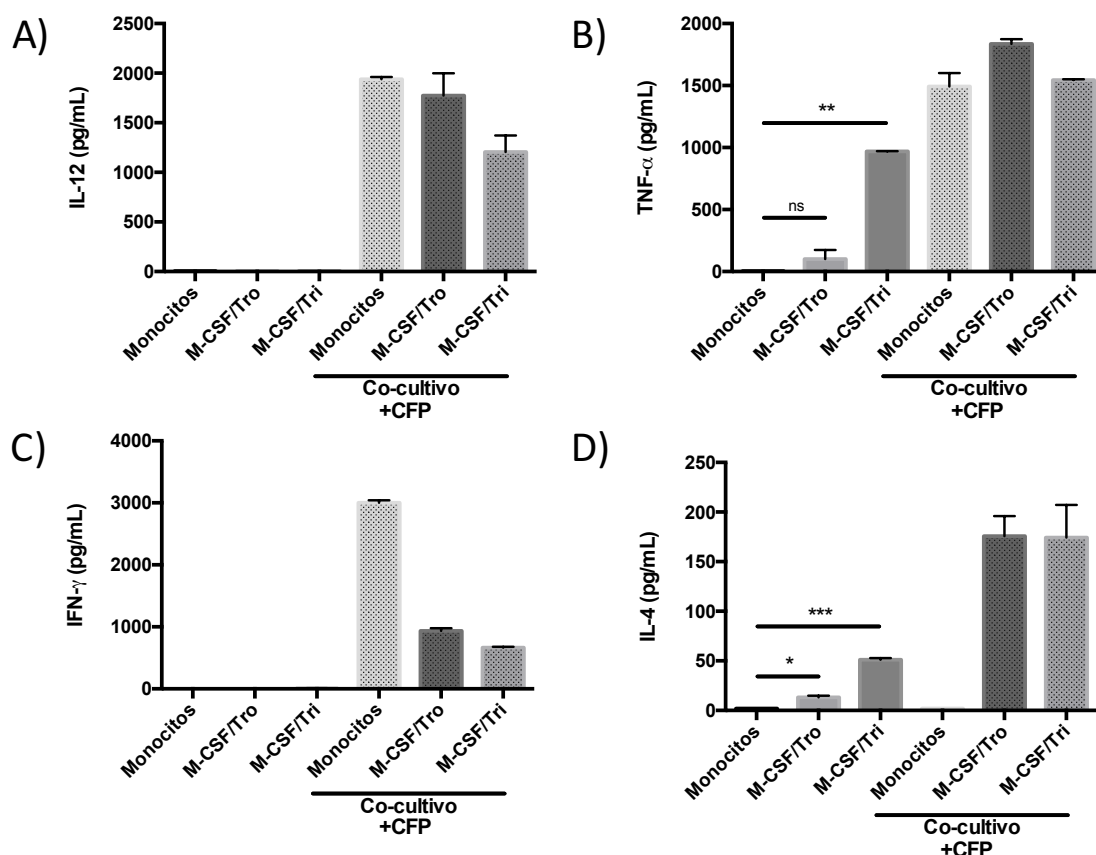


**Figura 32. Producción de citocinas en MΦ M2 estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

Por otro lado, cuando se cuantificaron las citocinas producidas por los controles se observó que al igual que en el caso anterior, se adquirió el mismo comportamiento con la producción de citocinas Th1, lo que aseguró la veracidad de los resultados. Con los resultados obtenidos hasta este punto fue posible evidenciar como la naturaleza de los antígenos de *M. tuberculosis* tienen la capacidad de polarizar el fenotipo de MΦ M2 al de MΦ M2.

#### **8.7.2. Los MΦ M2 diferenciados por acción de trombina y tripsina incrementan la producción de IL-4 posterior al estímulo con CFP.**

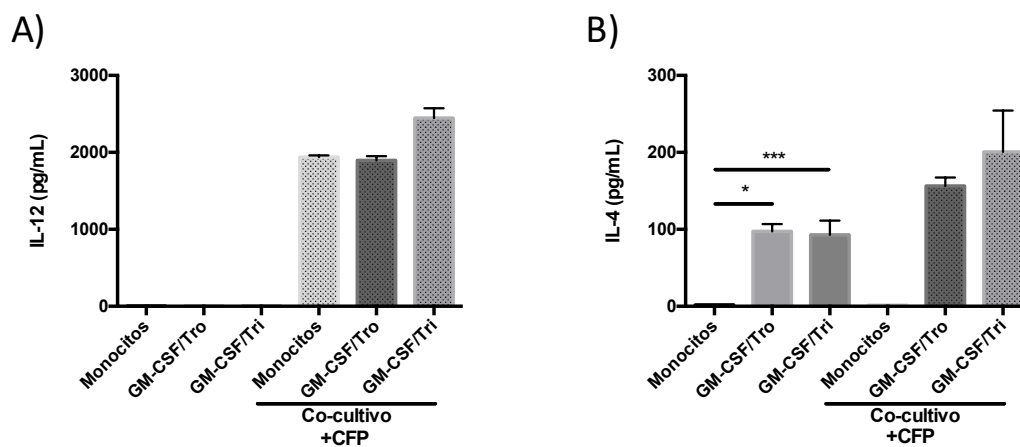
Como se había observado previamente, cuando las proteasas trombina y tripsina se emplearon para inducir la polarización de los monocitos se observó que estos adquirirían un fenotipo tipo MΦ M2 con la producción de IL-4 (Figura 33D). En esta serie de experimentos donde también se observó una nula producción de IL-12 (Figura 33A) e IFN- $\gamma$  (Figura 33C) se observó un incremento discreto en el TNF- $\alpha$  (Figura 33B), en conjunto y salvo por la producción de TNF- $\alpha$  se sostuvo el resultado previamente obtenido. Cuando en estas condiciones de diferenciación se realizó una estimulación con CFP en presencia de linfocitos autólogos (co-cultivo) se observó un aumento en la producción de las citocinas Th1 IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , como se observó en aquellos MΦ polarizados M1, sin embargo, cuando los monocitos son diferenciados con las enzimas trombina y tripsina el resultado del co-cultivo también mostró un incremento en la producción de IL-4.



**Figura 33. Producción de citocinas en MΦ diferenciados con M-CSF más trombina y tripsina, y estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

Cuando en el proceso de diferenciación se emplearon las enzimas trombina y tripsina con la diferencia de utilizar el GM-CSF en lugar del M-CSF (factor de crecimiento empleado en el resultado anterior) el perfil se mantuvo, mostrando nula producción de IL-12 (Figura 34A) y una positividad en el resultado de IL-4 (Figura 34B) en el momento de la diferenciación. Posteriormente, cuando se realizó el co-cultivo, ambas citocinas se incrementaron manteniendo el mismo fenómeno observado previamente,

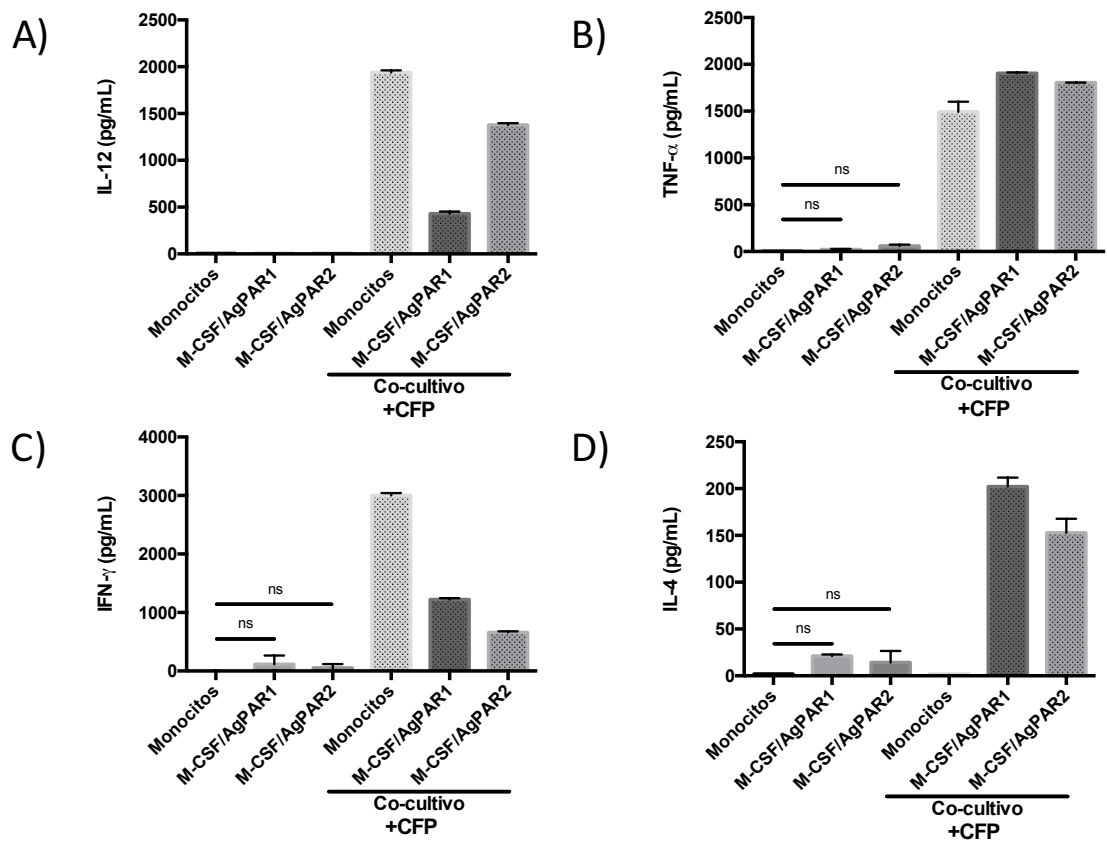
sosteniendo que indistintamente del factor de crecimiento tanto la trombina como la tripsina indujeron el mismo fenotipo.



**Figura 34. Producción de citocinas en MΦ diferenciados con GM-CSF más trombina y tripsina, y estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

Retomando la especificidad de la activación de los receptores PARs en la polarización de MΦ, ya se había observado que cuando se emplearon los agonistas peptídicos para la activación de estos receptores se promovía la producción de IL-4 (Figura 35D) pero no de IL-12 (Figura 35A) lo que sostenía el resultado observado en las enzimas. Al mismo tiempo, en estas mismas condiciones de diferenciación también se observaron, aunque despreciables, niveles en la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 35B) e IFN- $\gamma$  (Figura 35C).

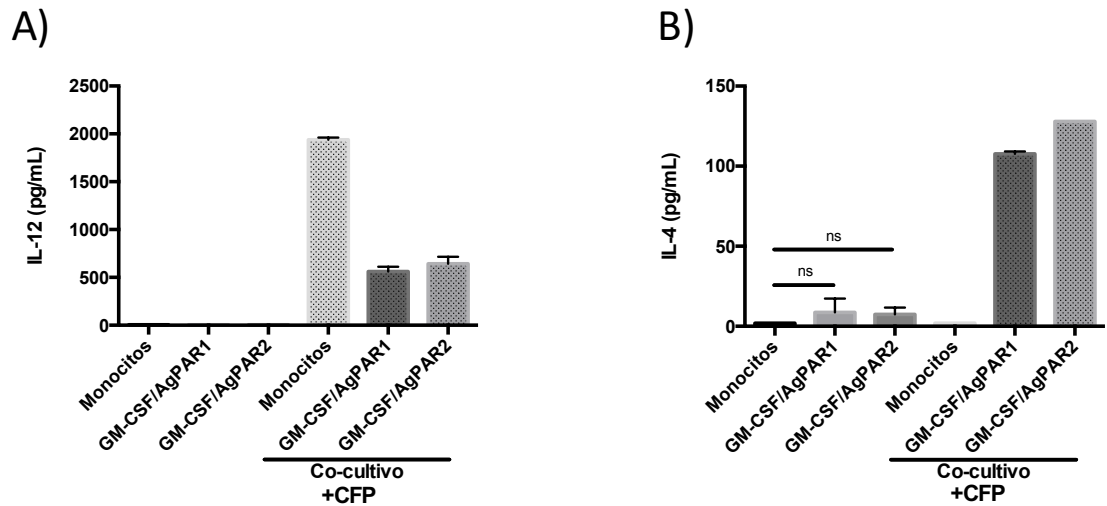
En estas condiciones de diferenciación igualmente se evaluó la producción de citocinas posteriores a la estimulación con los antígenos de *M. tuberculosis*, en los cuales apareció el mismo patrón de citocinas incrementando la producción de IL-4 pero también recuperando la producción de las citocinas Th1.



**Figura 35. Producción de citocinas en MΦ diferenciados con M-CSF más el agonista de PAR1/PAR2, y estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

Los mismos resultados se mantuvieron cuando se empleó como factor de crecimiento el GM-CSF más los agonistas peptídicos, mostrando esa nula producción de IL-12 que se recuperó después de la estimulación con CFP (Figura 36A) y la producción de IL-4 que se potencio tras la estimulación en el co-cultivo (Figura 36B).





**Figura 36. Producción de citocinas en MΦ diferenciados con GM-CSF más el agonista de PAR1/PAR2 y estimulados con CFP de *M. tuberculosis*. ( $p < 0.05$ ).**

En conjunto los últimos dos resultados son evidencia que la previa la activación de los receptores PARs en los monocitos, los MΦ obtenidos adoptaran un fenotipo M2 con la particularidad de una irreversibilidad en el mismo.

## CAPÍTULO 9

### DISCUSIÓN

Este proyecto tuvo como finalidad el conocer el efecto que generaban las serin proteasas trombina y tripsina sobre la polarización de monocitos, además de observar el perfil de citocinas producto de los MΦ diferenciados cuando estos eran estimulados con los antígenos de *M. tuberculosis*. En este sentido, conocer la pureza de la población inicial de las células purificadas por inmunomagnetismo fue relevante, ya que garantizaría los futuros resultados; con base en lo anterior se determinó la expresión de CD14 como marcador específico de esta población celular, como lo menciona Geissmann *et. al.*<sup>203</sup>, así como la expresión de CD11b como se menciona en los trabajos de Pilling *et. al.*<sup>204</sup>. Por otro lado, cuando evaluamos la expresión de los marcadores de diferenciación observamos niveles de expresión tan bajos que apenas rebasan el uno por ciento en la población celular CD14<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, lo cual es coincidente con lo reportado en la literatura, en donde la expresión basal del receptor CD206, así como el CCR7 e incluso el CD163 en los monocitos se encuentra en muy bajos niveles<sup>203–205</sup>.

La expresión de los receptores PARs en los monocitos es algo que ya era conocido y cuya descripción fue realizada por Colognato *et. al.* en el 2003, en la cual se menciona como las células del sistema fagocítico mononuclear se distinguen por expresar el receptor PAR1, PAR2 y PAR3, donde el PAR2 es el que se expresa a más bajos niveles<sup>202</sup>, de manera similar a lo observado en el análisis cuantitativo por citometría de flujo realizado en este estudio.

Una vez que se verificó el fenotipo de las células monocíticas purificadas, estas se emplearon para los diferentes programas de diferenciación, en los cuales la primera observación fue conocer el morfotipo que estas adquirirían, resultando en características bien marcadas las que adquirirían los MΦ M1 diferenciados con GM-CSF más IFN- $\gamma$ /LPS, en los cuales se aprecia una estructura alargada tipo fibroblasto, la cual es igual en todas las células, caso contrario, en aquellas células que fueron estimuladas con M-CSF más IL-4 su estructura presentaba una alta tasa de heterogeneidad, no mostrando características tan conservadas entre las células, salvo quizá los aparentes pseudópodos que presentaban estos MΦ. El trabajo de Vogel *et. al.* es la mejor referencia para comparar estos resultados morfológicos en los cuales ellos observan toda la variedad de efectos morfológicos, no solo dependientes del IFN- $\gamma$ /LPS y la IL-4, sino también del empleo o no de los factores de crecimiento GM-CSG y M-CSF, donde si bien su resultado morfológico de presuntos MΦ M1 es muy similar al obtenido en este trabajo, el de los MΦ M2 no se asemeja tanto<sup>201</sup>. Entre las diferencias que podrían explicar la variabilidad del resultado está el tiempo de incubación que en nuestro caso fue de diez días, contra los

seis días en el protocolo de Jaguin *et. al.*, y/o la implementación de M-CSF más IL-4 posteriores a una estimulación con solamente M-CSF<sup>200</sup>, donde en todo caso sea el M-CSF el estímulo que conllevó a nuestro resultado.

Las diferencias morfológicas, sin embargo, no son características definitivas que permitan la identificación del fenotipo de los MΦ obtenidos. El receptor de quimiocina CCR7 y el receptor de manosa (CD206), han sido previamente determinados sus niveles basales, dado que posteriores a los estímulos de diferenciación estos aparecerían en mayor concentración, siendo el CCR7 un receptor expresado en aquellas células pro-inflamatorias como los MΦ M1 pero que a la fecha no se sabe si está presente en los macrófago M2<sup>206</sup>. Por otro lado, en los MΦ M2 el CD206 funciona como un marcador de diferenciación<sup>197</sup>, mientras que en los resultados obtenidos en este trabajo, los MΦ diferenciados con IFN-γ/LPS hacia el fenotipo M1 también expresan este receptor. Sin embargo, si bien es cierto que el IFN-γ es un promotor para que el receptor de manosa deje de expresarse, cuando este se emplea en conjunto con factores de crecimiento tanto GM-CSF como el M-CSF, estos desfavorecen la función del IFN-γ permiten la producción del receptor en su superficie<sup>201</sup>.

No es si no hasta la producción de citocinas lo que nos habla de una manera más concreta el fenotipo de células que se están estudiando, de manera que los resultados obtenidos en este trabajo empatan con lo mostrado por otros autores, en los que la producción de IL-12 siempre es superior en los MΦ diferenciados a M1 con respecto a los M2, y este resultado es inclusive independiente del factor de crecimiento<sup>200,201</sup>. Por su parte, en los MΦ M2 la

producción de IL-4 resulta ser un marcador igualmente específico como lo es la IL-12 para los MΦ M1, mostrando su producción dependiente de citocinas como la IL-10 e incluso la propia IL-4<sup>207</sup> como en este trabajo.

Con base en la importancia que tiene la determinación de los marcadores de superficie y la producción de citocinas para el establecimiento de un fenotipo específico, como se realizó en los MΦ M1 y M2, este mismo sistema es el que se aplicó para conocer el resultado de estimular a los monocitos con las enzimas trombina y tripsina. White y Gomer realizaron una serie de experimentos en los cuales estudiaron el efecto que tienen las proteasas trombina, tripsina y triptasa sobre CMSP, observando la expresión de los marcadores CD206, CD163 y CCR7, además de la cuantificación de IL-4, IL-13, IL-10 e IL-12. En primera instancia sus resultados apuntan al establecimiento de un fenotipo M2 dada la reducción del CCR7 con respecto a los otros dos receptores, sin embargo, en las citocinas permanece un perfil mezclado que no podría discernir entre fenotipos, sin embargo, cuando los ensayos se realizan en monocitos purificados, el efecto sobre el CCR7 se repite y aunque la producción de IL-4 es elevada, persiste la producción de IL-12. Cuando se comparan estos resultados con los aquí obtenidos observamos el mismo efecto sobre el CCR7, sosteniendo por un lado la capacidad de modulación, esto apoyado en nuestro caso por la nula producción de IL-12. La evidencia que presentan White y Gomer es fuertemente sugerente de una polarización de los MΦ hacia el fenotipo M2 por acción de las serin proteasas, y nuestros resultados apoyan este hecho al evidenciar la despreciable producción de IFN- $\gamma$

y TNF- $\alpha$ , sugiriendo que el programa que adoptan los monocitos se inclina al de un fenotipo anti-inflamatorio<sup>199</sup>. Además, como producto de este trabajo también se observó el efecto que presentaban los factores de crecimiento GM-CSF y M-CSF en compañía tanto de la trombina como de la tripsina, mostrando una producción diferencial de IL-4 y nula producción de IL-12, sin embargo, el fenotipo IL-4<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> era conservado en las cuatro condiciones de diferenciación.

Los M $\Phi$  han demostrado ser una estirpe celular con funciones de suma importancia en la infección por *M. tuberculosis*, siendo fuertes promotores de una respuesta asociada a la respuesta inmune Th1, pero a la vez inductores de citocinas que ayudan a la regulación de la inflamación<sup>197</sup>. Los resultados mostraron que la estimulación sobre M $\Phi$  “clásicamente diferenciados” con IFN- $\gamma$ /LPS e IL-4 a los fenotipos M1 y M2 respectivamente con antígenos de *M. tuberculosis* en presencia de linfocitos autólogos, eran inductores de una respuesta celular tipo Th1 con la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y la inhibición de la IL-4 de los M $\Phi$  M2, lo cual era de esperarse en aquellos M $\Phi$  previamente diferenciados a M1, pero no esperado en aquellos M $\Phi$  M2, sin embargo considerando la capacidad de plasticidad en estas células es un fenómeno que se vuelve sencillo de asimilar<sup>208</sup>.

Por su parte aquellas células estimuladas con las serin proteasas trombina y tripsina adoptaron un fenotipo tipo M2 y tuvieron un comportamiento algo distinto cuando fueron puestas en contacto con la población de linfocitos y en presencia de CFP de *M. tuberculosis*. En este caso además de la producción

de las mismas citocinas asociadas a inflamación IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , también se observó un incremento en la producción de IL-4, manteniendo realmente un microambiente combinado de citocinas. Los M $\Phi$  son una población celular que pueden mantener un amplio rango de funciones que a la vez pueden resultar contradictorios, participando en la promoción de la respuesta inflamatoria, promover la angiogénesis, inhibir el crecimiento tumoral, inducir la remodelación del tejido o incluso generar muerte celular<sup>206,209,210</sup>. Este contexto mezclado llama mucho la atención debido al escenario en el que se presenta, donde la naturaleza del co-cultivo no permite saber con certeza si esas citocinas son propias de una célula previamente diferenciada, una célula que fue activada tras el reconocimiento de un antígeno específico o son un conjunto de ambas; Huang *et. al.* proponen que ambos fenotipos de M $\Phi$  co-existen en la tuberculosis, donde los M1 se encargan de promover la formación del granuloma mientras que los M2 se relacionan a inhibir este proceso<sup>197</sup>.

El resultado de la activación de los receptores PAR1 y PAR2 en los monocitos y su participación en la diferenciación a M $\Phi$  M2, generó una serie de preguntas adicionales, en particular, el saber cuál es el mecanismo que lleva a este fenotipo que es evidentemente distinto al resultado de la polarización con base en la IL-4, y si esta vía en la que persiste, aparentemente, un fenotipo anti-inflamatorio puede ser uno de los aspectos no elucidados en la infección por *M. tuberculosis*.

## **CAPÍTULO 10**

### **CONCLUSIÓN**

Las serin proteasas trombina y tripsina polarizan la diferenciación de los MΦ hacia el fenotipo M2, y a diferencia de los MΦ M2 generados por IL-4, en una estimulación con CFP de *M. tuberculosis* el fenotipo M2 se mantiene, por lo que la activación específica de los receptores PAR1 y PAR2 en los MΦ tiene como consecuencia la polarización de la respuesta de las células T hacia el perfil Th2.

En el siguiente esquema se resumen los resultados obtenidos en este proyecto, con los eventos de diferenciación para el fenotipo M1, M2 y el obtenido de la activación de los receptores PARs, además del perfil de citocinas obtenido del co-cultivo entre los MΦ diferenciados y linfocitos T específicos en presencia de CFP de *M. tuberculosis*.



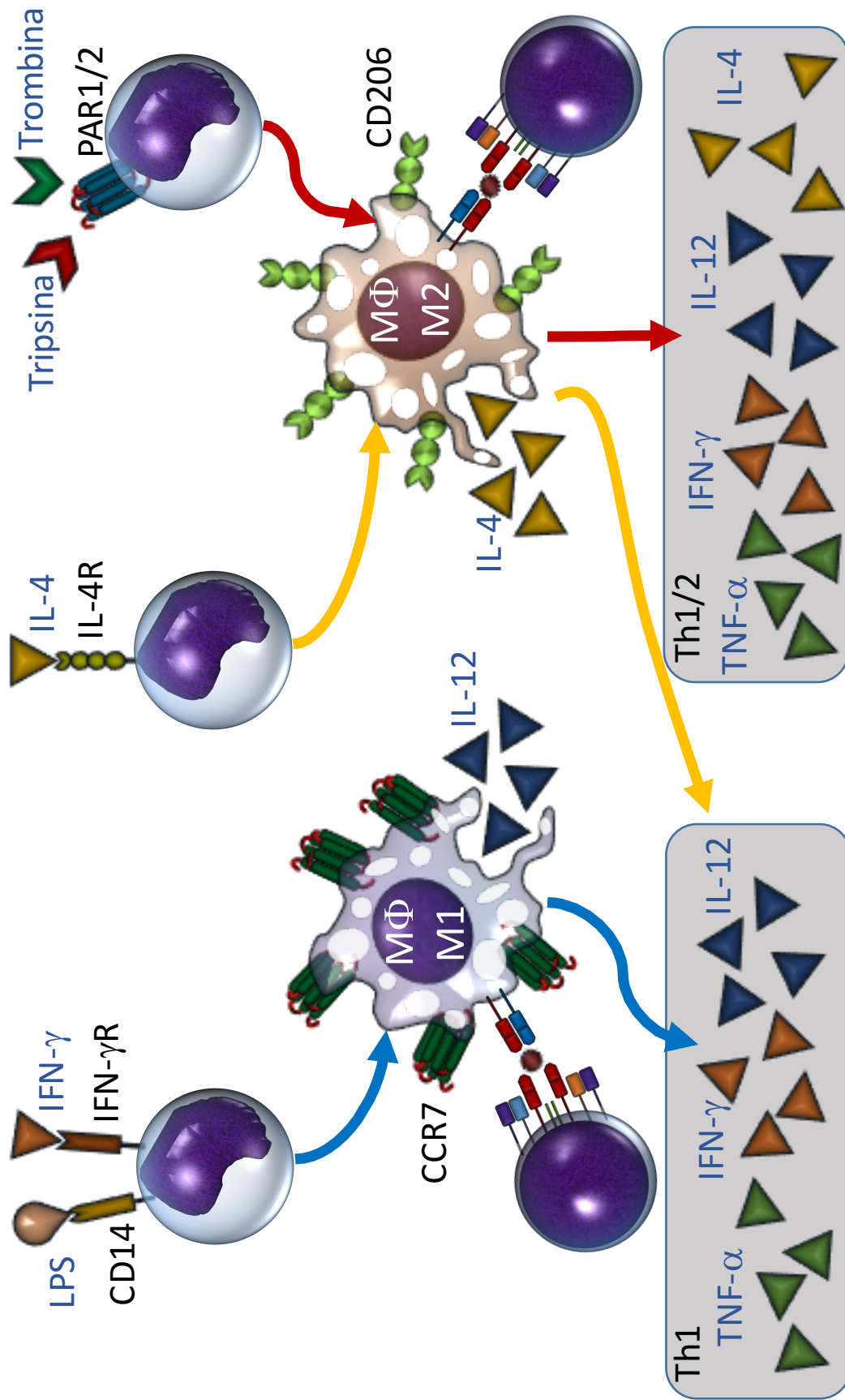


Figura 37. Polarización de MΦ dependientes del estímulo IFN- $\gamma$ /LPS, IL-4 y trombina/tripsina, y su perfil de citocinas en respuesta a CFP de *M. tuberculosis*.

## **CAPÍTULO 11**

### **PERSPECTIVAS**

Dentro de las perspectivas planteadas producto de los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran evaluar las vías de señalización acopladas a la activación de los receptores PAR1 y PAR2 implicadas en la polarización irreversible de los MΦ hacia el fenotipo M2, de manera que se pueda entender el mecanismo de activación de este fenotipo mediante esta vía.

Por otro lado, se pretende identificar las serin proteasas en el genoma de *M. tuberculosis* y evaluar su efecto sobre la activación de PAR1 y PAR2 y conocer su implicación en cuanto a la polarización de MΦ y el establecimiento de una respuesta de células T, de manera que puedan ser asociadas como potenciales factores de virulencia con base en la modulación de una respuesta inmune.

## REFERENCIAS.

1. Gutierrez, M. C. *et al.* Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1, (2005).
2. Hershberg, R. *et al.* High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *PLoS Biol.* 6, (2008).
3. Brosch, R. *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3684–3689 (2002).
4. Comas, I. & Gagneux, S. The Past and Future of Tuberculosis Research. *PLoS Pathog.* 5, (2009).
5. Comas, I. *et al.* Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat. Genet.* 45, 1176–1182 (2013).
6. Wirth, T. *et al.* Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathog.* 4, (2008).
7. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Klin. Wochenschr.* 11, 490–492 (1932).
8. ARRIAGA, A. K., OROZCO, E. H., AGUILAR, L. D., ROOK, G. A. W. & PANDO, R. H. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 229–237 (2002).
9. Golden, M. P. & Vikram, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am. Fam. Physician* 72, 1761–1768 (2005).
10. Cavalcanti, Y. V. N., Brelaz, M. C. A., Neves, J. K. de A. L., Ferraz, J. C. & Pereira, V. R. A. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulm. Med.* 2012, (2012).
11. OMS | Informe de la consulta de la OMS sobre el fortalecimiento de la participación activa de las organizaciones de la sociedad civil en la prevención, el tratamiento y el control de la tuberculosis a escala mundial. *WHO* Available at:

[http://www.who.int/tb/publications/2010/WHO\\_HTM\\_TB\\_2010.15/es/](http://www.who.int/tb/publications/2010/WHO_HTM_TB_2010.15/es/).

(Accessed: 12th June 2017)

12. Koneman, E. W. & Allen, S. *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. (Ed. Médica Panamericana, 2008).
13. van Ingen, J. *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 653–655 (2012).
14. Delogu, G., Sali, M. & Fadda, G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 5, (2013).
15. Panteix, G. *et al.* Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J. Med. Microbiol.* 59, 984–989 (2010).
16. Pfyffer, G. E., Auckenthaler, R., van Embden, J. D. & van Soolingen, D. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 631–634 (1998).
17. OMS | Tuberculosis. WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Accessed: 12th June 2017)
18. Tortoli, E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 159–178 (2006).
19. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544 (1998).
20. Garcia, L. S. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (American Society for Microbiology Press, 2010).
21. Barry III, C. E. *et al.* Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* 37, 143–179 (1998).
22. Daffé, M. & Draper, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203 (1998).
23. Niederweis, M. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Mol. Microbiol.* 49, 1167–1177 (2003).
24. Hestvik, A. L. K., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 1041–1050 (2005).

25. Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M. & Normark, S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3, 1033–1040 (2002).
26. Sturgill-Koszycki, S. *et al.* Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678–681 (1994).
27. Simeone, R. *et al.* Cytosolic Access of Mycobacterium tuberculosis: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLoS Pathog.* 11, (2015).
28. van der Wel, N. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* 129, 1287–1298 (2007).
29. Amer, A. O. & Swanson, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 56–61 (2002).
30. Cook, G. M. *et al.* Physiology of Mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 55, 81–319 (2009).
31. Schnappinger, D. *et al.* Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages. *J. Exp. Med.* 198, 693–704 (2003).
32. Abdallah, A. M. *et al.* Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 883–891 (2007).
33. Gonzalez-Juarrero, M. *et al.* Immune Response to Mycobacterium tuberculosis and Identification of Molecular Markers of Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 398–409 (2009).
34. North, R. J. & Jung, Y.-J. Immunity to Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599–623 (2004).
35. Bloch, A. B. *et al.* The epidemiology of tuberculosis in the United States. Implications for diagnosis and treatment. *Clin. Chest Med.* 10, 297–313 (1989).
36. Iademarco, M. F. & Castro, K. G. Epidemiology of tuberculosis. *Semin. Respir. Infect.* 18, 225–240 (2003).

37. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. *gob.mx* Available at: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>. (Accessed: 12th June 2017)
38. Lawn, S. D. & Zumla, A. I. Tuberculosis. *The Lancet* 378, 57–72 (2011).
39. Jindal, S. K. *Textbook of Pulmonary and Critical Care Medicine Vols 1 and 2*. (JP Medical Ltd, 2011).
40. Ghosh, A. K. *Mayo Clinic Internal Medicine Board Review*. (OUP USA, 2010).
41. Ray, S., Talukdar, A., Kundu, S., Khanra, D. & Sonthalia, N. Diagnosis and management of miliary tuberculosis: current state and future perspectives. *Ther. Clin. Risk Manag.* 9, 9–26 (2013).
42. Cabello, R. R. *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. (Ed. Médica Panamericana, 2007).
43. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Microbiología Médica + StudentConsult*. (Elsevier España, 2013).
44. Parrish, N. M., Dick, J. D. & Bishai, W. R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 6, 107–112 (1998).
45. Dickinson, J. M. & Mitchison, D. A. Experimental Models to Explain the High Sterilizing Activity of Rifampin in the Chemotherapy of Tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123, 367–371 (1981).
46. Corbett, E. L. *et al.* The Growing Burden of Tuberculosis: Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163, 1009–1021 (2003).
47. J, R., Kenneth. *Sherri's: microbiología médica (5a. ed.)*. (McGraw Hill Mexico, 2011).
48. Sasindran, S. J. & Torrelles, J. B. *Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?* *Front. Microbiol.* 2, (2011).

49. Cooper, A. M. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393–422 (2009).
50. Ulrichs, T. & Kaufmann, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* 208, 261–269 (2006).
51. Cooper, A. M., Magram, J., Ferrante, J. & Orme, I. M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med.* 186, 39–45 (1997).
52. Flynn, J. L. & Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 93–129 (2001).
53. MacMicking, J. D. *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5243–5248 (1997).
54. Scanga, C. A. *et al.* The Inducible Nitric Oxide Synthase Locus Confers Protection against Aerogenic Challenge of Both Clinical and Laboratory Strains of Mycobacterium tuberculosis in Mice. *Infect. Immun.* 69, 7711–7717 (2001).
55. Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8841–8848 (2000).
56. Russell, D. G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell Host Microbe* 8, 68–76 (2010).
57. Fabri, M. *et al.* Vitamin D Is Required for IFN- $\gamma$ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci. Transl. Med.* 3, 104ra102 (2011).
58. Saraiva, M. & O’Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181 (2010).
59. Fiorentino, D. F. *et al.* IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444–3451 (1991).
60. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. & O’Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815–3822 (1991).

61. Moore, K. W., Malefyt, R. de W., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765 (2001).
62. Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549–1555 (1991).
63. Redford, P. S. *et al.* Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur. J. Immunol.* 40, 2200–2210 (2010).
64. Bastos, K. R. B. *et al.* Role of Endogenous IFN- $\gamma$  in Macrophage Programming Induced by IL-12 and IL-18. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 399–410 (2007).
65. O'Garra, A. *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 475–527 (2013).
66. Babu, S. *et al.* Human Type 1 and 17 Responses in Latent Tuberculosis Are Modulated by Coincident Filarial Infection through Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 and Programmed Death-1. *J. Infect. Dis.* 200, 288–298 (2009).
67. Elias, D., Britton, S., Aseffa, A., Engers, H. & Akuffo, H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production. *Vaccine* 26, 3897–3902 (2008).
68. Resende Co, T., Hirsch, C. S., Toossi, Z., Dietze, R. & Ribeiro-Rodrigues, R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 147, 45–52 (2007).
69. Guirado, E., Schlesinger, L. S. & Kaplan, G. Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe. *Semin. Immunopathol.* 35, 563–583 (2013).
70. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774 (2011).
71. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5, (2014).



72. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964 (2005).
73. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197 (2000).
74. Fogg, D. K. *et al.* A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* 311, 83–87 (2006).
75. Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830 (2013).
76. Liu, K. *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392–397 (2009).
77. McKenzie, S. B. *Hematología clínica*. (El Manual Moderno, 1991).
78. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 533–544 (2008).
79. Burgess, A. W. & Metcalf, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947–958 (1980).
80. Gasson, J. C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77, 1131–1145 (1991).
81. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1 (2014).
82. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80 (2010).
83. Muraille, E., Leo, O. & Moser, M. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? *Front. Immunol.* 5, (2014).
84. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front. Immunol.* 5, (2014).
85. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39, 925–938 (2013).

86. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 6, 498–510 (2013).
87. Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104 (2014).
88. Guillemins, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 210, 1977–1992 (2013).
89. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* 6, (2015).
90. Gautier, E. L. *et al.* Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity. *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128 (2012).
91. van Furth, R. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Semin. Hematol.* 7, 125–141 (1970).
92. van Furth, R. & Cohn, Z. A. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J. Exp. Med.* 128, 415–435 (1968).
93. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35 (2014).
94. Sieweke, M. H. & Allen, J. E. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science* 342, 1242974 (2013).
95. McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J. & Palis, J. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669–1675 (2003).
96. Lichanska, A. M. & Hume, D. A. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp. Hematol.* 28, 601–611 (2000).
97. Takahashi, K., Yamamura, F. & Naito, M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J. Leukoc. Biol.* 45, 87–96 (1989).

98. Schulz, C. *et al.* A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86–90 (2012).
99. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644 (2008).
100. Naito, M., Hasegawa, G. & Takahashi, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* 39, 350–364 (1997).
101. Hoeffel, G. *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181 (2012).
102. Hoeffel, G. *et al.* C-Myb<sup>+</sup> Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 42, 665–678 (2015).
103. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Nat. Immunol.* 15, 929–937 (2014).
104. Molawi, K. *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* 211, 2151–2158 (2014).
105. Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science* 332, 1284–1288 (2011).
106. Ní Gabhann, J. *et al.* Btk Regulates Macrophage Polarization in Response to Lipopolysaccharide. *PLoS ONE* 9, (2014).
107. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 750–761 (2011).
108. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20 (2014).
109. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327, 656–661 (2010).
110. Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv. Wound Care* 1, 10–16 (2012).

111. Galván-Peña, S. & O'Neill, L. A. J. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 5, (2014).
112. Saha, B., Bruneau, J. C., Kodys, K. & Szabo, G. Alcohol-induced miR-27a regulates differentiation and M2 macrophage polarization of normal human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 3079–3087 (2015).
113. Spence, S. *et al.* RETRACTED: Suppressors of Cytokine Signaling 2 and 3 Diametrically Control Macrophage Polarization. *Immunity* 38, 66–78 (2013).
114. Crane, M. J. *et al.* The Monocyte to Macrophage Transition in the Murine Sterile Wound. *PLOS ONE* 9, e86660 (2014).
115. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047 (2007).
116. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317, 666–670 (2007).
117. Heydtmann, M. Macrophages in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections. *J. Virol.* 83, 2796–2802 (2009).
118. Labonte, A. C., Tosello-Tramont, A.-C. & Hahn, Y. S. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. *Mol. Cells* 37, 275–285 (2014).
119. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35 (2003).
120. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173 (2000).
121. Charles A. Janeway, J. & Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216 (2002).
122. Mills, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 463–488 (2012).
123. Unanue, E. R. Antigen-Presenting Function of the Macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395–428 (1984).

124. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896 (2010).
125. Stout, R. D. & Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76, 509–513 (2004).
126. Jenner, R. G. & Young, R. A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 281–294 (2005).
127. Nau, G. J. *et al.* Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1503–1508 (2002).
128. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.* 181, 3733–3739 (2008).
129. Paciello, I. *et al.* Intracellular Shigella remodels its LPS to dampen the innate immune recognition and evade inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4345–E4354 (2013).
130. Xu, F. *et al.* Akt1-Mediated Regulation of Macrophage Polarization in a Murine Model of Staphylococcus aureus Pulmonary Infection. *J. Infect. Dis.* 208, 528–538 (2013).
131. Eisele, N. A. *et al.* Salmonella require the fatty acid regulator PPAR $\delta$  for the establishment of a metabolic environment essential for long term persistence. *Cell Host Microbe* 14, 171–182 (2013).
132. Ehrt, S. *et al.* Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J. Exp. Med.* 194, 1123–1140 (2001).
133. Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A. & Locati, M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 32, 241–247 (2011).

134. Deretic, V. *et al.* Endosomal membrane traffic: convergence point targeted by *Mycobacterium tuberculosis* and HIV. *Cell. Microbiol.* 6, 999–1009 (2004).
135. Martinez, F. O., Helming, L. & Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483 (2009).
136. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 89, 557–563 (2011).
137. Raju, B. *et al.* Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in Pulmonary TB. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 88, 39–51 (2008).
138. Kahnert, A. *et al.* Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 36, 631–647 (2006).
139. Liao, X. *et al.* Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 121, 2736–2749 (2011).
140. Martinez, F. O. Regulators of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* 41, 1531–1534 (2011).
141. Chieppa, M. *et al.* Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *J. Immunol.* 171, 4552–4560 (2003).
142. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785–799 (2006).
143. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597–635 (1998).
144. Antalis, T. M., Shea-Donohue, T., Vogel, S. N., Sears, C. & Fasano, A. Mechanisms of Disease: protease functions in intestinal mucosal pathobiology. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 393–402 (2007).
145. Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M. & López-Otín, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4, 544–558 (2003).

146. López-Otín, C. & Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7, 800–808 (2007).
147. López-Otín, C. & Bond, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J. Biol. Chem.* 283, 30433–30437 (2008).
148. Neurath, H. & Walsh, K. A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3825–3832 (1976).
149. Ruiz-Perez, F. & Nataro, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 745–770 (2014).
150. Ingmer, H. & Brøndsted, L. Proteases in bacterial pathogenesis. *Res. Microbiol.* 160, 704–710 (2009).
151. Dulon, S. *et al.* Proteinase-Activated Receptor-2 and Human Lung Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 339–346 (2003).
152. Steinhoff, M. *et al.* Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* 26, 1–43 (2005).
153. Dulon, S. *et al.* Pseudomonas aeruginosa Elastase Disables Proteinase-Activated Receptor 2 in Respiratory Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 411–419 (2005).
154. Vu, T.-K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64, 1057–1068 (1991).
155. Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A.-K., Strömbeck, B. & Sundelin, J. Molecular Cloning and Functional Expression of the Gene Encoding the Human Proteinase-Activated Receptor 2. *Eur. J. Biochem.* 232, 84–89 (1995).
156. Ishihara, H. *et al.* Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386, 502–506 (1997).
157. Kahn, M. L. *et al.* A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690–694 (1998).

158. Xu, W. *et al.* Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6642–6646 (1998).
159. Scarborough, R. M. *et al.* Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.* 267, 13146–13149 (1992).
160. Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D. & Plevin, R. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 245–282 (2001).
161. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258–264 (2000).
162. Camerer, E., Huang, W. & Coughlin, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5255–5260 (2000).
163. Riewald, M. & Ruf, W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7742–7747 (2001).
164. Ossovskaya, V. S. & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* 84, 579–621 (2004).
165. Akers, I. A. *et al.* Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L193–L201 (2000).
166. Berger, P. *et al.* Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 91, 1372–1379 (2001).
167. Sambrano, G. R. *et al.* Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets. *J. Biol. Chem.* 275, 6819–6823 (2000).
168. Shpacovitch, V., Feld, M., Bunnett, N. W. & Steinhoff, M. Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 541–550 (2007).



169. Uehara, A., Sugawara, S., Muramoto, K. & Takada, H. Activation of Human Oral Epithelial Cells by Neutrophil Proteinase 3 Through Protease-Activated Receptor-2. *J. Immunol.* 169, 4594–4603 (2002).
170. King, C., Brennan, S., Thompson, P. J. & Stewart, G. A. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3645–3651 (1998).
171. Sun, G., Stacey, M. A., Schmidt, M., Mori, L. & Mattoli, S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1014–1021 (2001).
172. Lourbakos, A. *et al.* Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett.* 435, 45–48 (1998).
173. Lourbakos, A. *et al.* Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion. *Infect. Immun.* 69, 5121–5130 (2001).
174. Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- $\kappa$ B through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 10, 1491–1504 (2008).
175. Kajikawa, H. *et al.* *Helicobacter pylori* Activates Gastric Epithelial Cells to Produce Interleukin-8 via Protease-Activated Receptor 2. *Digestion* 76, 248–255 (2007).
176. Kida, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. *Serratia marcescens* Serralyisin Induces Inflammatory Responses through Protease-Activated Receptor 2. *Infect. Immun.* 75, 164–174 (2007).
177. Kouzaki, H., O'Grady, S. M., Lawrence, C. B. & Kita, H. Proteases Induce Production of Thymic Stromal Lymphopoietin by Airway Epithelial Cells through Protease-Activated Receptor-2. *J. Immunol.* 183, 1427–1434 (2009).

178. Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H. & Coughlin, S. R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* 103, 879–887 (1999).
179. Buresi, M. C. *et al.* Protease-activated receptor-1 stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  secretion in human intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G323–G332 (2001).
180. Buresi, M. C., Buret, A. G., Hollenberg, M. D. & MacNaughton, W. K. Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1515–1525 (2002).
181. Cuffe, J. E. *et al.* Basolateral PAR-2 receptors mediate  $\text{KCl}$  secretion and inhibition of  $\text{Na}^+$  absorption in the mouse distal colon. *J. Physiol.* 539, 209–222 (2002).
182. Bohm, S. K. *et al.* Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem. J.* 314, 1009–1016 (1996).
183. Kong, W. *et al.* Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8884–8889 (1997).
184. Kawabata, A. *et al.* The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J. Clin. Invest.* 107, 1443–1450 (2001).
185. Vaughan, P. J., Pike, C. J., Cotman, C. W. & Cunningham, D. D. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J. Neurosci.* 15, 5389–5401 (1995).
186. Donovan, F. M., Pike, C. J., Cotman, C. W. & Cunningham, D. D. Thrombin Induces Apoptosis in Cultured Neurons and Astrocytes via a Pathway Requiring Tyrosine Kinase and RhoA Activities. *J. Neurosci.* 17, 5316–5326 (1997).

187. Suo, Z., Wu, M., Citron, B. A., Gao, C. & Festoff, B. W. Persistent Protease-activated Receptor 4 Signaling Mediates Thrombin-induced Microglial Activation. *J. Biol. Chem.* 278, 31177–31183 (2003).
188. Seiberg, M. *et al.* The Protease-Activated Receptor 2 Regulates Pigmentation via Keratinocyte-Melanocyte Interactions. *Exp. Cell Res.* 254, 25–32 (2000).
189. Sharlow, E. R. *et al.* The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci* 113, 3093–3101 (2000).
190. Algermissen, B. *et al.* Distribution and potential biologic function of the thrombin receptor PAR-1 on human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 488–495 (2000).
191. Santulli, R. J. *et al.* Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9151–9155 (1995).
192. Chen, Y. H., Pouyssegur, J., Courtneidge, S. A. & Van Obberghen-Schilling, E. Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 27372–27377 (1994).
193. Tsopanoglou, N. E. & Maragoudakis, M. E. On the Mechanism of Thrombin-induced Angiogenesis POTENTIATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ACTIVITY ON ENDOTHELIAL CELLS BY UP-REGULATION OF ITS RECEPTORS. *J. Biol. Chem.* 274, 23969–23976 (1999).
194. Hou, L. *et al.* Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology* 94, 356–362 (1998).
195. Wakita, H., Furukawa, F. & Takigawa, M. Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 109, 190–207 (1997).

196. Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S. & Altare, F. Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nat. Immunol.* 10, 943–948 (2009).
197. Huang, Z. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. *PLoS ONE* 10, (2015).
198. Reece, S. T. *et al.* Serine protease activity contributes to control of Mycobacterium tuberculosis in hypoxic lung granulomas in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 3365–3376 (2010).
199. White, M. J. V. & Gomer, R. H. Trypsin, Tryptase, and Thrombin Polarize Macrophages towards a Pro-Fibrotic M2a Phenotype. *PLoS ONE* 10, (2015).
200. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O. & Lecureur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 281, 51–61 (2013).
201. Vogel, D. Y. S. *et al.* Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219, 695–703 (2014).
202. Colognato, R. *et al.* Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* 102, 2645–2652 (2003).
203. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19, 71–82 (2003).
204. Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B. & Gomer, R. H. Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts. *PLoS ONE* 4, (2009).
205. Le Nouën, C. *et al.* Low CCR7-Mediated Migration of Human Monocyte Derived Dendritic Cells in Response to Human Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. *PLoS Pathog.* 7, (2011).

206. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686 (2004).
207. Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M. & Hayashi, Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int. Immunol.* 27, 131–141 (2015).
208. Sica, A., Invernizzi, P. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 59, 2034–2042 (2014).
209. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604 (2010).
210. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 453–461 (2008).